

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Micheline GUINAND

PREMIÈRE THÈSE

Structure de la peptidolipine NA, peptidolipide
de *Nocardia asteroides*

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 15 mai 1965 devant la Commission d'examen

MM. J. CHOPIN

Président

E. LEDERER

G. MICHEL

} Examineurs

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Micheline GUINAND

PREMIÈRE THÈSE

Structure de la peptidolipine NA, peptidolipide
de *Nocardia asteroides*

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 15 mai 1965 devant la Commission d'examen

MM. J. CHOPIN

E. LEDERER

G. MICHEL

Président

Examineurs



FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

Doyens honoraires

MM. LONGCHAMBON, MOUSSA, GAUTHIER Henri.

Professeurs honoraires

MM. LOCQUIN, de LARAMBERGUE, SOLLAUD, MENTZER, MOUSSA, JAFFARD,
Henri EYRAUD, DEJARDIN, VIRET.

Doyen

M. BRACONNIER.

Assesseurs

MM. MESNARD, BOLDIN.

Professeurs

MM. LONGCHAMBON	Minéralogie	MM. SARAZIN	Physique nucléaire
PRETTRE	Chimie industrielle	BOLDIN	Microbiologie et Mycologie
COURTY	Chimie-Physique	PERES	Physiologie
KUHNER	Botanique	MESNARD	Electronique
MALECOT	Mécanique rationnelle et appliquée	GRANDMONTAGNE	Physique
PARIS	Chimie minérale	BOUILLIER	Minéralogie
AUMERAS	Chimie	LAFOUCRIERE	Physique nucléaire théorique
COLONGE	Chimie organique	DREUX	Chimie organique
JANIN	Physique générale	TEICHNER	Chimie industrielle
FLANDRIN	Géologie appliquée	PAVANS DE CECCATTY	Zoologie
BERNARD	Physique industrielle	MERLIN	Chimie analytique
DUFAY Jean	Astronomie	DUFAY Maurice	Physique de l'Atmosphère
NIGON	Zoologie expérimentale	LUBET	Physiologie
GAUTHIER Henri	Géologie générale	PHILBERT	Physique nucléaire
WAUTIER	Zoologie	COHEN-ADAD	Chimie
CHOPIN	Chimie biologique	DAVID Louis	Géologie générale
CUEILLERON	Chimie	CHANEL	Psychophysiologie
BRACONNIER	Calcul différentiel et intégral	MAURY	Méthodes mathématiques de la Physique
EYRAUD Charles	Chimie-Physique appliquée	GAUTHIER Jean	Chimie
DEPRAZ	Physique nucléaire	GAUME	Physique expérimentale

Professeurs sans chaire

MM. FERON	Mathématiques
LAFORGUE	Physique
LEGAY	Zoologie expérimentale S. P. C. N.
UZAN	Physique S. P. C. N.
CHENEVOY	Géologie appliquée
GINET	Zoologie
ASCH	Physique
MICHEL Pierre	Minéralogie
DUCET	Biologie végétale
Mlle MAITROT	Physique
MM. GEVIN	Géologie générale
PONASSE	Mathématiques
d'INCAN	Physique
LEFEBVRE	Mathématiques
PERNET	Mathématiques
CHERY	Physique
BERGEON	Physique C. S. U.
Mlle GAUTHERON	Chimie biologique

Maîtres de Conférences

Mme ERICSON	Physique générale
MM. MARTEL	Mécanique
MATHIEU	Mécanique des Fluides
ERBEIA	Physique
DESCOTES	Chimie organique
PICARD Philippe	Mathématiques
LEMOIGNE	Botanique
DEMARCO	Géologie générale
MICHEL Georges	Biochimie
LEBRETON	Biologie végétale
DAVID Jean	Biologie animale
TOUSSET	Chimie propédeutique
FEUVRAIS	Physique Electricité
PICARD Claude	Mathématiques
SCHMITT	Physique M. P. C.
LAURENT	Chimie organique
ROT	Mathématiques
BETHOUX	Mathématiques
Mlle CALAIS	Mathématiques
GUSAKOW	Physique
Mlle THOMAS	Chimie Minérale

Maître de Conférences adjoint

M. PIERRON Chimie

Conseiller Administratif

M. BURNET

Secrétaire Principal Honoraire

M. ROUX

En hommage à Monsieur GEORGES MICHEL
qui m'a enseigné la CHIMIE BIOLOGIQUE

La structure de la peptidolipine NA a été déterminée au laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté Catholique des Sciences de Lyon.

Monsieur Georges Michel, Maître de Conférences à la Faculté des Sciences de Lyon, a dirigé mes recherches. Je le remercie pour l'attention avec laquelle il a suivi mes travaux et pour tous les conseils qu'il m'a donnés.

Monsieur Edgar Lederer, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris, m'accorde l'honneur de sa présence dans mon jury. L'intérêt qu'il a toujours porté à mon travail m'a souvent encouragée. Je lui exprime ma profonde reconnaissance.

Monsieur Jean Chopin, Professeur à la Faculté des Sciences de Lyon, accepte de présider mon jury. Je lui adresse mes sincères remerciements.

J'ai eu le plaisir d'effectuer un stage au laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Paris sous la direction de Monsieur Pierre Jollès, Directeur de Recherches au Centre National de la Recherche Scientifique. Je lui témoigne ma gratitude pour son accueil bienveillant.

Je remercie enfin Mademoiselle Marie-Jeanne Mérel de son aide diligente et amicale.

INTRODUCTION

Les *Nocardia* appartiennent à la famille des Actinomycetaceae dans l'ordre des Actinomycetales (1). Ils sont fréquemment isolés de leur habitat naturel, le sol. Ce sont des germes saprophytes qui peuvent devenir exceptionnellement pathogènes (2). *Nocardia asteroides* est responsable de la nocardiose, maladie pulmonaire, qui évolue en affections cutanées ou en abcès cérébraux ; *Nocardia brasiliensis* qui est assez répandu au Mexique et en Amérique du Sud, provoque des tumeurs polyfistulisées appelées mycétomes.

Les premières recherches concernant les *Nocardia* ont eu pour but l'isolement et l'étude de nouveaux antibiotiques. C'est ainsi que les ristocétines A et B de *Nocardia lurida* ont trouvé une utilisation clinique, sous le nom de spontine, dans le traitement des infections à staphylocoques (3) (4).

Des structures ont été proposées pour quelques uns de ces antibiotiques. La mycomycine, isolée de *Nocardia acidophilus* (5) est un acide polyéthylénique et polyacétylénique $C_{13}H_{10}O_2$ (6). L'azomycine produite par une espèce de *Nocardia* voisine de *Nocardia mesenterica* est le 2-nitro-imidazole (7). On peut séparer la noformicine, $C_8H_{15}N_5O$, des milieux de culture de *Nocardia formica* par chromatographie sur charbon ou sur échangeur de cations (8) (9). Enfin, la nocardamine est un métabolite d'une espèce indéterminée de *Nocardia* dont la structure cyclique proposée en 1951 (10) n'a été précisée qu'en 1961 (11).

L'étude des propriétés immunologiques des *Nocardia* a orienté les travaux dans une autre voie. En effet *Nocardia asteroides* possède, comme les mycobactéries, une activité adjuvante puisqu'en suspension dans l'huile de paraffine il stimule la production d'anticorps (12). Dans le cas de souches humaines de *Mycobacterium tuberculosis* une fraction lipidique azotée, les cires D, possède la plus grande partie de l'activité adjuvante des bacilles entiers. C'est pourquoi Michel a commencé l'étude des lipides des *Nocardia* (13).

La composition en acides gras de plusieurs souches a été déterminée (14). Il s'agit d'acides saturés à chaîne droite de C_{14} à C_{19} l'acide palmitique étant le constituant principal. Les acides saturés à chaîne ramifiée comprennent les acides iso et anteiso C_{15} , C_{16} , C_{17} , iso C_{18} et l'acide tuberculostérique. Plusieurs acides éthyléniques ont été identifiés, acides 9-hexadécénoïque, 10-hexadécénoïque, 9-heptadécénoïque et acide oléique.

Les lipides de *Nocardia brasiliensis* 733 renferment un alcool le 16-hentriacontanol (15). De *Nocardia asteroides* ATCC 9969 on a isolé les acides nocardiques, acides polyinsaturés de type mycolique, avec 50 atomes de carbone (16) (17) et les nocardols, alcools à haut poids moléculaire (18).

Au cours de l'étude de cette dernière souche une fraction lipidique azotée a été obtenue (13). Nous en avons extrait un peptidolipide, la peptidolipine NA (19) (20) (21) ; la détermination de sa structure est exposée dans notre thèse.

Nous démontrons que le lipide, un β -hydroxyacide, est lié à la chaîne peptidique par ses deux groupements fonctionnels, par le carboxyle (liaison amide) et par l'hydroxyle (liaison ester). Par suite la peptidolipine NA a une structure lactonique macrocyclique.

Dans le premier chapitre, nous décrivons quelques antibiotiques peptidiques : peptidolipides et peptides à structure lactonique macrocyclique, renfermant comme la peptidolipine NA des D-aminoacides. Certaines méthodes d'étude de ces composés ont été utilisées au cours de notre travail.

Dans les chapitres suivants nous exposons les résultats de nos recherches.

Le dernier chapitre est consacré à la description des expériences.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553409_0047

CHAPITRE I

ANTIBIOTIQUES PEPTIDIQUES

Parmi les antibiotiques, les composés de nature peptidique forment un groupe important. En effet, depuis la découverte de la pénicilline en 1929, plus de 60 antibiotiques peptidiques ont été mentionnés dans la littérature. Quelques uns ne renferment que des acides aminés, d'autres contiennent, en plus, différents constituants parmi lesquels des sucres aminés ou des acides gras.

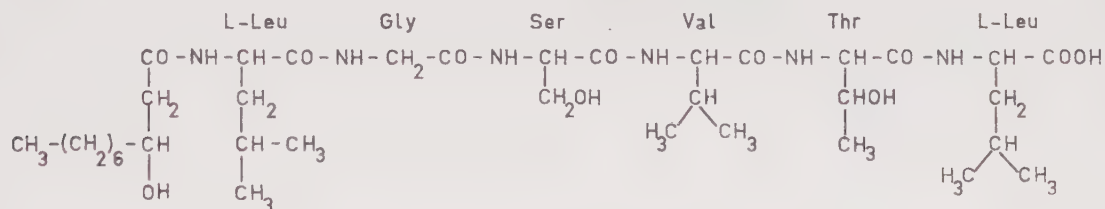
Dans ce chapitre nous étudions les antibiotiques qui présentent une analogie structurale avec la peptidolipine NA, c'est-à-dire les peptidolipides, dont la plupart possèdent d'ailleurs un squelette cyclique et les peptides à structure macrocyclique lactonique.

I - PEPTIDOLIPIDES

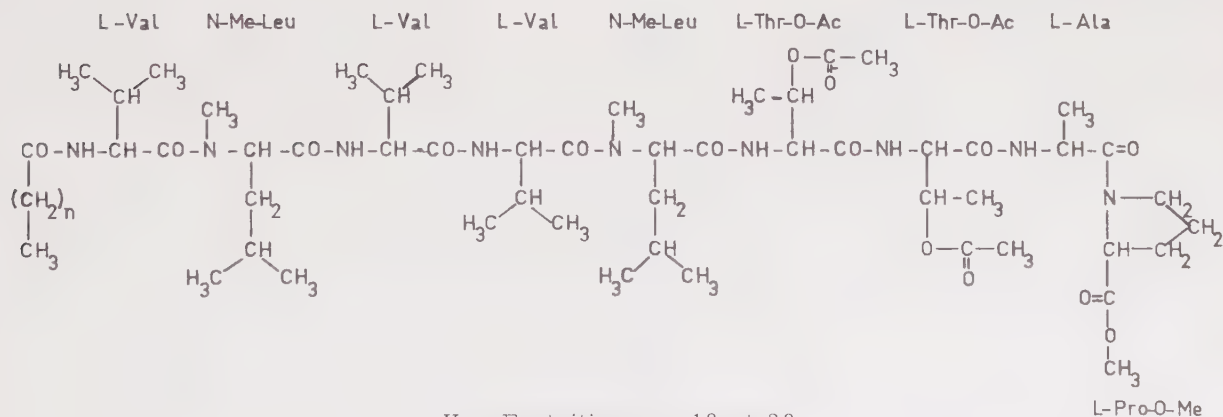
Les peptidolipides renferment un ou plusieurs constituants liposolubles liés à la partie peptidique. Ils sont solubles dans les solvants organiques.

Deux peptidolipides non cycliques ont été isolés des microorganismes : la viscosine de *Pseudomonas viscosa* (22) et la fortuitine de *Mycobacterium fortuitum* (23). Leur activité biologique n'a pas été précisée.

La partie lipidique constituée dans un cas par l'acide 3-hydroxydécanoïque, dans l'autre par des quantités équimoléculaires d'acide eicosanoïque et d'acide docosanoïque, est liée à la partie peptidique par une fonction amide. Les formules I et II leur ont été attribuées.



I - Viscosine



II Fortuitine n = 18 et 20

Les autres peptidolipides ont une structure cyclique et possèdent généralement une activité antibiotique. Ils ont certains caractères communs, en particulier des aminoacides inhabituels, D-aminoacides et N-méthyl aminoacides.

On peut les classer en deux groupes :

- les composés à cycle peptidique dans lesquels l'acide gras combiné à l'un des acides aminés est extérieur au cycle.
- les composés où la partie lipidique fait elle-même partie du cycle. Ce sont les depsipeptides.

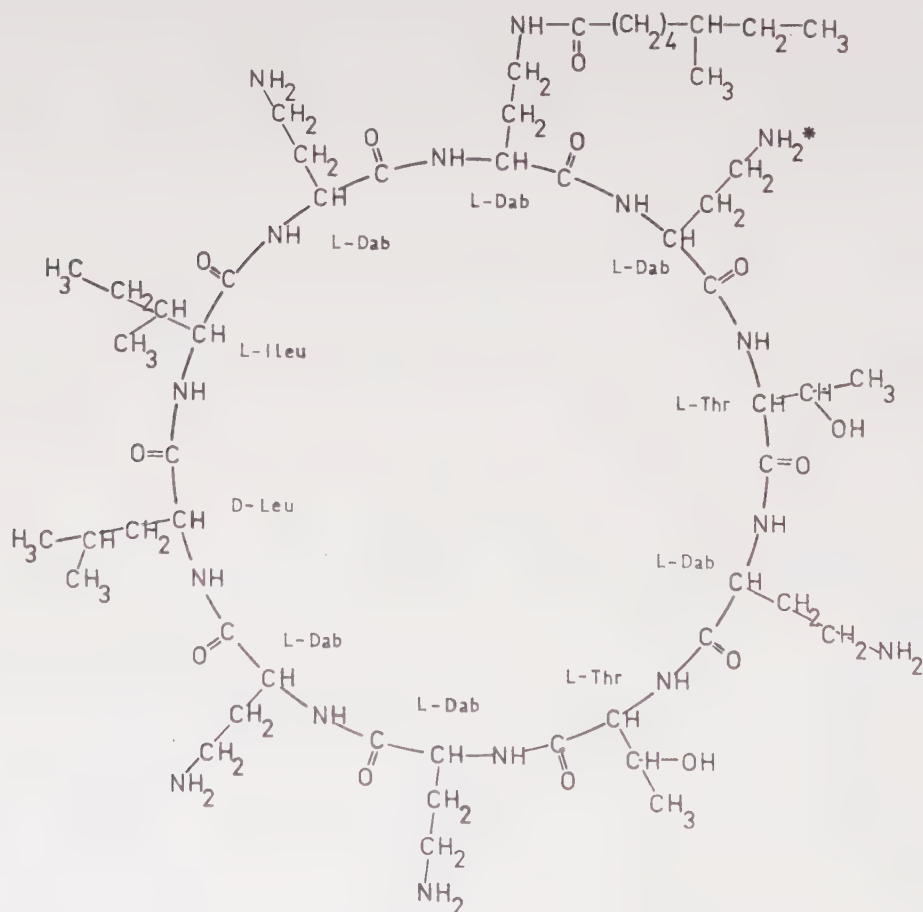
1/ Peptidolipides à cycle peptidique.

Il s'agit des circulines et des polymyxines. Ces antibiotiques, actifs contre les bactéries gram -, ont en commun plusieurs constituants dont l'acide L- α - γ -diaminobutyrique (L-Dab) et l'acide isopélargonique (Ipel). Ce dernier est lié à la partie peptidique par le groupement γ aminé de l'acide L- α - γ -diaminobutyrique dans le cas des circulines et par le groupement α aminé du même acide dans le cas des polymyxines.

A - Circulines. Les circulines sont produites par *Bacillus circulans*, souche Q 19. On distingue les circulines A et B (24).

La circuline A possède la formule III. Les différents constituants existent dans les proportions molaires : L-Dab, L-Thr, D-Leu, L-Ileu, Ipel (6:2:1:1:1).

La circuline B a une structure analogue, mais l'acide isopélargonique est fixé sur le groupement γ aminé marqué d'un astérisque dans la formule III.



III - Circuline A

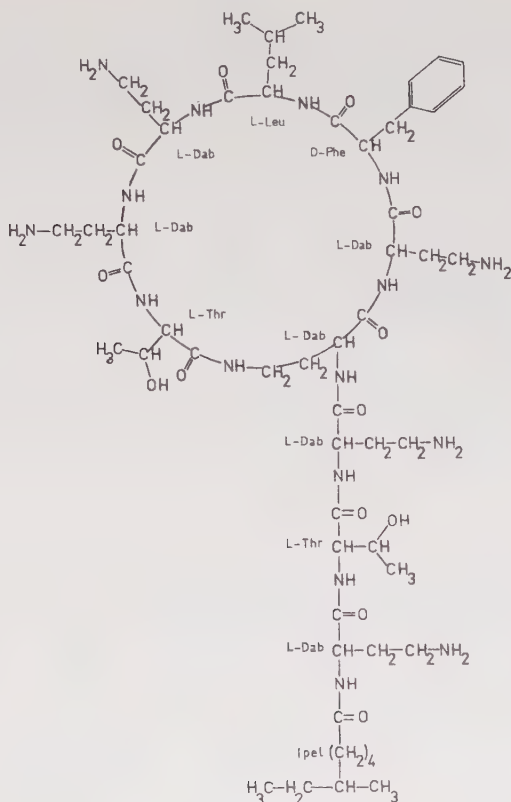
B - Polymyxines. *Bacillus polymyxa* donne un mélange de peptidolipides, qui ont été séparés en 1947, en cinq composés : les polymyxines A, B, C, D et E (25). Plus tard, en 1954, la polymyxine B a été dédoublée en deux fractions B₁ et B₂ qui ne diffèrent que par la nature de l'acide gras : B₂ contient l'acide octanoïque tandis que B₁ renferme l'acide isopélargonique (26).

- Polymyxine B₁ - La polymyxine B₁ a été particulièrement étudiée. Elle possède les constituants suivants : Dab, L-Thr, L-Leu, D-Phe et Ipel, dans le rapport molaire 6:2:1:1:1. Différentes formules avaient été proposées en 1956 et 1957 (27) (28) mais la structure exacte n'avait pas été déterminée. Le problème a été repris en 1960. La synthèse de substances voisines de la polymyxine B₁ et la comparaison de leur activité antibactérienne avec celle de l'antibiotique naturel ont montré qu'aucune d'entre elles n'est identique à la polymyxine B₁ (29) (30).

En 1963, Suzuki et coll. ont précisé deux points importants :

- tous les résidus d'acide diaminobutyrique ont la configuration L
- la chaîne latérale est fixée sur le cycle peptidique par le groupement α aminé d'un acide L-diaminobutyrique (31).

Ces résultats ont permis d'attribuer la formule IV à la polymyxine B₁. Cette structure a été confirmée par synthèse en 1964 (32).



IV - Polymyxine B₁

- Polymyxine E - On a identifié récemment la polymyxine E à un autre antibiotique, la colistine (33).

La colistine a été isolée par Koyama, en 1950, à partir du milieu de culture de *Bacillus colistinus* (34). On l'appelle parfois colimycine. Elle contient les mêmes aminoacides que les circulines à l'exception de la L-isoleucine qui est remplacée par la L-leucine. Les proportions molaires sont également identiques.

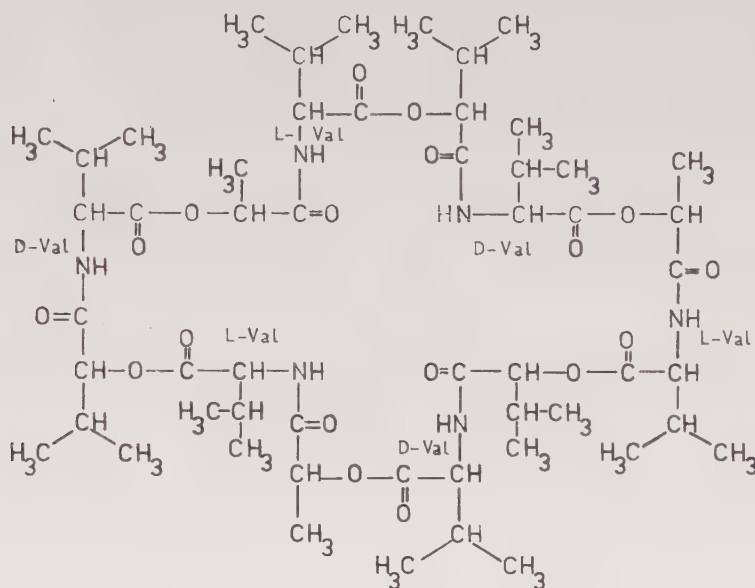
La structure partielle V proposée par Dautrevaux et Biserte est la dernière de celles qui ont déjà été attribuées à la colistine (35).

Notons que l'octadepsipeptide cyclique a aussi été synthétisé et qu'il possède une activité antibiotique comparable à celle du produit naturel (45).

Dans l'enniatine A, la N-méthyl-L-isoleucine remplace la N-méthyl-L-valine (46).

B - Valinomycine. Pour la valinomycine, extraite de *Streptomyces fulvissimus*, Brockmann suggérait la formule d'un cyclooctadepsipeptide composé alternativement de D-valine, d'acide L-lactique, de L-valine et d'acide D- α -hydroxyisovalérique (47). La présence simultanée de valine et d'acide α -hydroxyisovalérique mérite d'être soulignée.

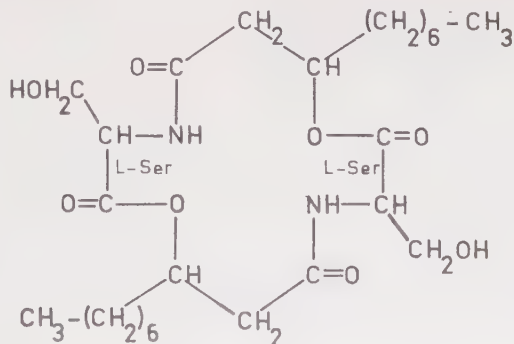
Cette structure est inexacte car le produit de synthèse correspondant obtenu par Shemyakin en 1963 (48) était inactif contre *M. tuberculosis* à des concentrations supérieures à 200 $\mu\text{g/ml}$. Une nouvelle détermination du poids moléculaire par Brockmann et par Shemyakin a donné une valeur correspondant au cyclodécadepsipeptide VII. La synthèse de ce dernier conduit effectivement à un produit qui possède une activité antibactérienne comparable à celle de la valinomycine contre *Candida albicans* à la concentration de 0,75 $\mu\text{g/ml}$ et contre *M. phlei* à la concentration de 4 $\mu\text{g/ml}$ (49).



VII - Valinomycine

C - Amidomycine. Vining et Taber proposaient pour l'amidomycine, isolée d'une espèce indéterminée de *Streptomyces*, la formule d'un octadepsipeptide composé alternativement de D-valine et d'acide D- α -hydroxyisovalérique (50). Shemyakin a démontré que le produit de synthèse correspondant est sans action contre *Candida albicans* à des concentrations supérieures à 200 $\mu\text{g/ml}$ et, par suite, que la formule proposée doit être révisée (48).

D - Serratamolide. Au cours de l'étude des pigments produits par différentes espèces de *Serratia*, Wasserman et coll. ont isolé un métabolite neutre le serratamolide (51). Une hydrolyse acide libère la L-sérine et l'acide D (-)-3-hydroxydécanoïque, tandis qu'une saponification ménagée conduit à l'acide serratamique qui est l'amide de l'acide D (-)-3-hydroxydécanoïque et de la L-sérine (52).

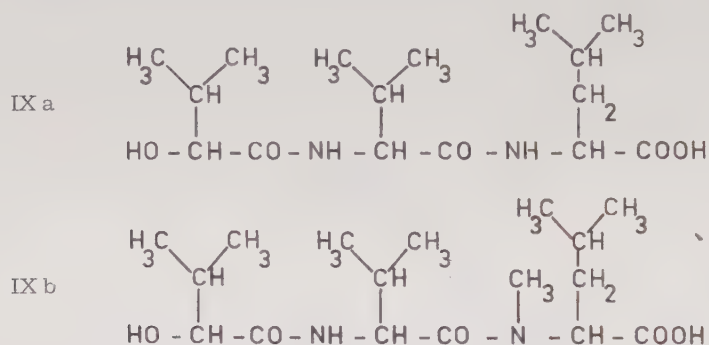


VIII - Serratamolide

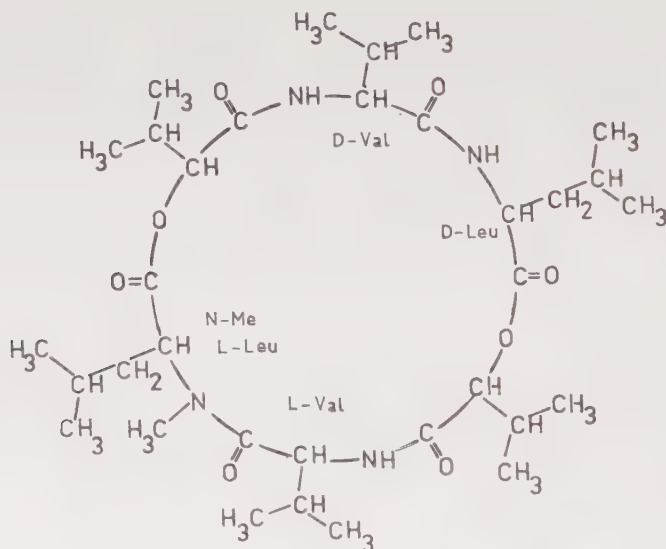
Il faut remarquer que l'hydroxyle de l'acide gras est en β et non en α du carboxyle.

E - Sporidesmolides. Le sporidesmolide I, $C_{33}H_{58}N_4O_8$ est un métabolite de *Pithomyces chartarum* (53) et 54). C'est un composé neutre qui donne par hydrolyse les acides aminés suivants : D-Val₁, L-Val₁, D-Leu₁, N-Me-L-Leu₁, et deux molécules d'acide L- α -hydroxyisovalérique. La présence d'un acide de la série L est assez exceptionnelle. Les divers acides naturels ayant en général la configuration D. Cet isomère n'avait jamais été isolé des produits naturels et seule la valinomycine contient un acide de cette série, l'acide L-lactique.

Une hydrolyse alcaline du sporidesmolide I conduit à un mélange d'acides sporidesmoliques A (formule IXa) et B (formule IXb), qui ne possèdent ni l'un ni l'autre de groupement aminé libre.



Russel propose pour le sporidesmolide I, la structure IX qui a été confirmée par synthèse (55).



IX - Sporidesmolide I

A côté du sporidesmolide I existe le sporidesmolide II auquel Russel attribue la structure IX avec une molécule de D-isoleucine à la place de la D-valine (54). Shemyakin précise qu'il s'agit en fait de D-*allo*-isoleucine (56).

Avec les sporidesmolides nous sommes en présence de certains depsipeptides qui ne répondent pas exactement à la définition de Shemyakin. Le sporidesmolide I possède une structure cyclique avec des acides α -hydroxylés et des acides α -aminés qui ne sont pas disposés alternativement comme dans les enniatines, la valinomycine, et l'amidomycine.

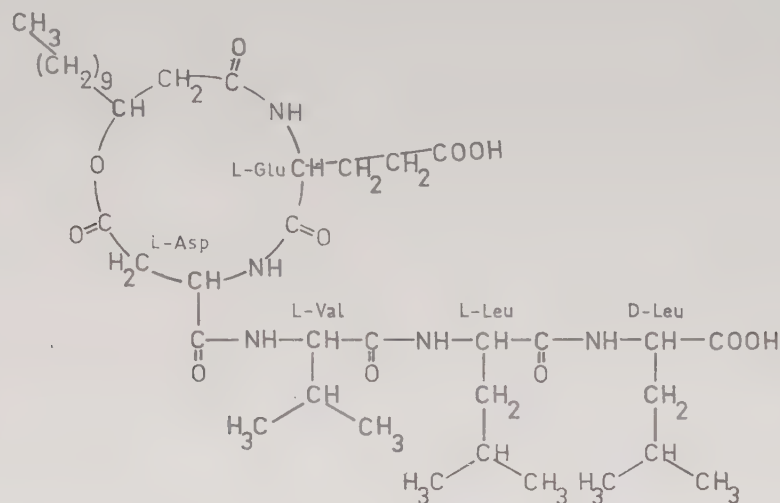
Le sporidesmolide I possède deux véritables séquences peptidiques. Ce schéma structural est encore plus accentué dans les composés suivants : espérine et isariine.

F - Espérine. L'espérine, $C_{39}H_{67}N_5O_{11}$, est un antibiotique produit par *Bacillus mesentericus* (57).

Une hydrolyse acide libère les acides aminés : L-Glu, L-Asp, L-Val, L-Leu, D-Leu, et l'acide 2-tridécénoïque.

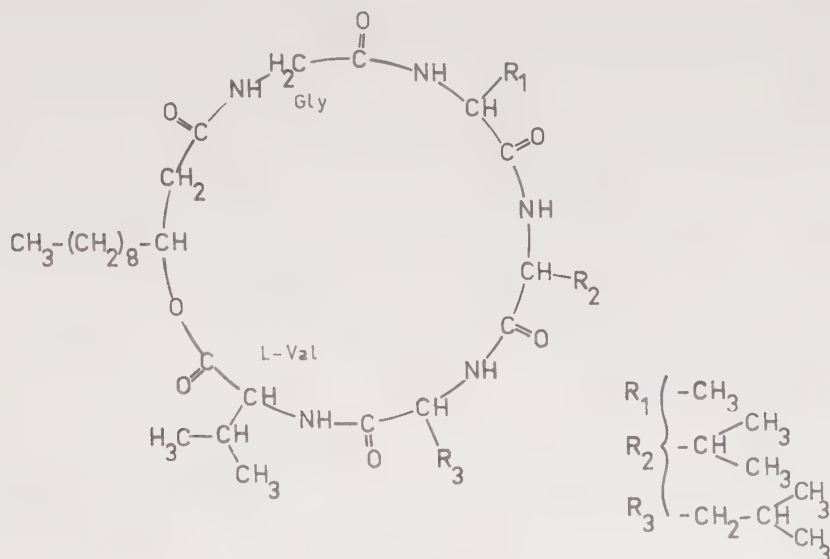
Après hydrolyse alcaline, l'espérine se transforme en acide espérinique qui est le β -hydroxytridécanyloxy-glutamyl-aspartyl-valyl-leucyl-leucine.

L'espérine a la formule X.



X - Espérine

G - Isariine. L'isariine, $\text{C}_{33}\text{H}_{59}\text{N}_5\text{O}_7$, est l'un des métabolites de *Isaria cretacea*. Après hydrolyse acide, cinq molécules d'acides aminés sont identifiées : L-Ala₁, L-Val₂, D-Leu₁, Gly₁, ainsi qu'un hydroxyacide, l'acide β -hydroxydodécanoïque (58). Ce dernier est lié au glycolle par une fonction amide et à la valine par une fonction ester. La séquence peptidique n'ayant pas été déterminée, l'isariine a la formule partielle XI.



XI - Isariine

II - PEPTIDES A STRUCTURE CYCLIQUE LACTONIQUE

Ces antibiotiques ne renferment pas de partie lipidique mais des acides aminés et d'autres composés : un groupement chromophore dans le cas des actinomycines, une molécule d'acide 3-hydroxypicolinique dans le cas de l'étamycine ou de la staphylomycine. Tous ont un cycle lactonique

formé de six ou sept acides aminés avec une molécule de thréonine liée à la fois par ses groupements carboxyle, aminé et hydroxyle. Comme les peptidolipides, ils sont solubles dans les solvants organiques.

1/ Actinomycines.

Les actinomycines sont actives contre les bactéries gram +. Elles ont d'autre part des propriétés antinéoplasiques (59).

Le groupe de actinomycines comprend des peptides hétéromériques découverts en 1940 par Waksman et Woodruff dans les milieux de culture d'*Actinomyces antibioticus* (60). C'est la première fois que des antibiotiques étaient isolés des Actinomycètes sous forme cristallisée. D'autres actinomycines ont été découvertes au cours des vingt années suivantes à partir d'une douzaine d'espèces différentes de *Streptomyces*. Elles possèdent toutes le même groupement chromophore mais se distinguent par la nature de leurs acides aminés (61).

A - Nomenclature. La nomenclature est assez confuse parce que les actinomycines coexistent en mélange et aussi parce qu'elles ont été étudiées par différents groupes de chercheurs.

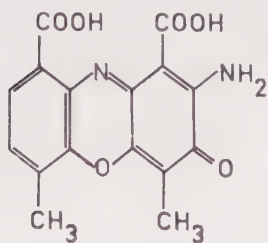
Ce problème a fait l'objet d'une mise au point par Brockmann en 1960 (62).

Les actinomycines A, B, et C ont été isolées les premières mais se sont révélées hétérogènes. La chromatographie sur papier donne différents composés que l'on a nommés, suivant leur ordre d'apparition sur le chromatogramme, par exemple C₁, C₂, C₃... Quant aux séries E et F elles ont été obtenues artificiellement, par biosynthèse dirigée. Après addition d'une grande quantité d'isoleucine au milieu de culture, on obtient les actinomycines E qui renferment de la N-méthyl isoleucine à la place occupée par la N-méthyl valine dans l'actinomycine C₃ (63). De même après addition de sarcosine, on constate que cet aminoacide remplace en partie ou en totalité la proline dans les actinomycines F (63).

Signalons enfin que Johnson et coll. qui étudient également les actinomycines, les désignent avec des chiffres romains : I, II, III... ce qui accroît encore la confusion.

Les actinomycines C ont été particulièrement étudiées et parmi elles l'actinomycine C₃ (64) et (65).

B - Actinomycine C₃. Le groupe chromophore rouge est appelé actinocinine. Sa formule est celle de l'acide 2-amino-4, 6-diméthyl-3 oxophénoxazine-1, 9-dicarboxylique.



Ce chromophore ressemble à celui des ommochromes, pigments d'insectes étudiés par Butenandt, et parmi lesquels on peut citer la xanthommatine (66). Il est semblable d'autre part à la cinnabarine, pigment du champignon *Coriolus sanguineus* (67). En utilisant des aminoacides marqués, Butenandt a montré que la xanthommatine dérivait du tryptophane. De la même manière, Katz a prouvé que l'actinocinine pouvait être considérée comme un dérivé du tryptophane (68).

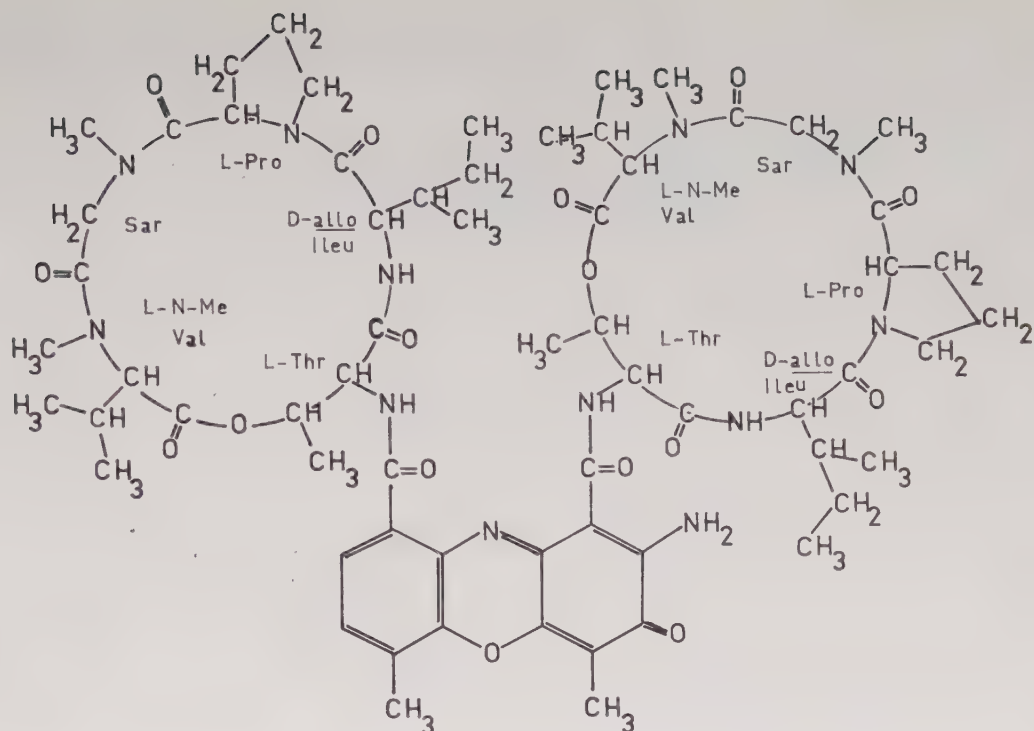
Dans l'actinomycine C₃, deux séquences pentapeptidiques (L-Thr - D-allo-Ileu - L-Pro - Sar - L-N-Me-Val) sont fixées sur le groupe chromophore par l'intermédiaire des deux molécules de thréonine. Une lactone se forme entre le groupement carboxylique libre du résidu de N-méthylvaline terminale et l'hydroxyle du résidu de thréonine, ce qui donne la structure XII.

La symétrie de la molécule est évidente et il est intéressant d'en étudier la biosynthèse. La cynurénine, produit de dégradation du tryptophane, peut être un intermédiaire dans la biogénèse de l'actinocinine ; l'acide 3-hydroxy-4-méthyl-anthranilique peut également être utilisé. On pense, généralement, que la séquence peptidique se fixe sur celui-ci avant la condensation qui conduit au chromophore.

L'actinomycine C₃ a été synthétisée (69).

2/ Etamycine.

L'isolement de l'étamycine à partir d'une espèce indéterminée de *Streptomyces* a été décrit en 1954, par Heinemann (70). En même temps, Bartz obtenait de *Streptomyces griseus* un antibiotique

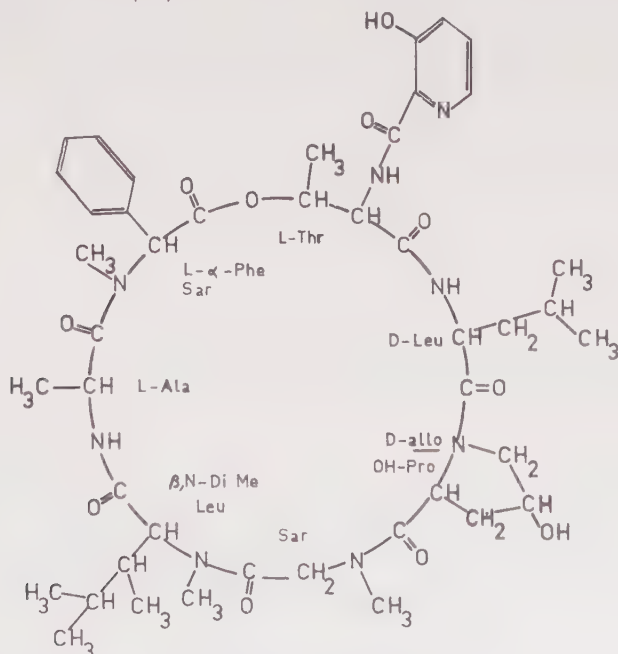


XII - Actinomycine C₃

appelé viridogriséine (71). Ces auteurs reconnaissent, par la suite, qu'étamycine et viridogriséine étaient identiques.

Quoique l'étamycine n'ait pas le caractère de haute toxicité des actinomycines, elle possède une activité appréciable contre les microorganismes gram + et contre *Mycobacterium tuberculosis*. De plus, elle provoque une leucopénie réversible chez les chiens.

L'étamycine a la formule XIII (72).



XIII - Etamycine

CHAPITRE II

ISOLEMENT ET PURIFICATION DE LA PEPTIDOLIPINE NA

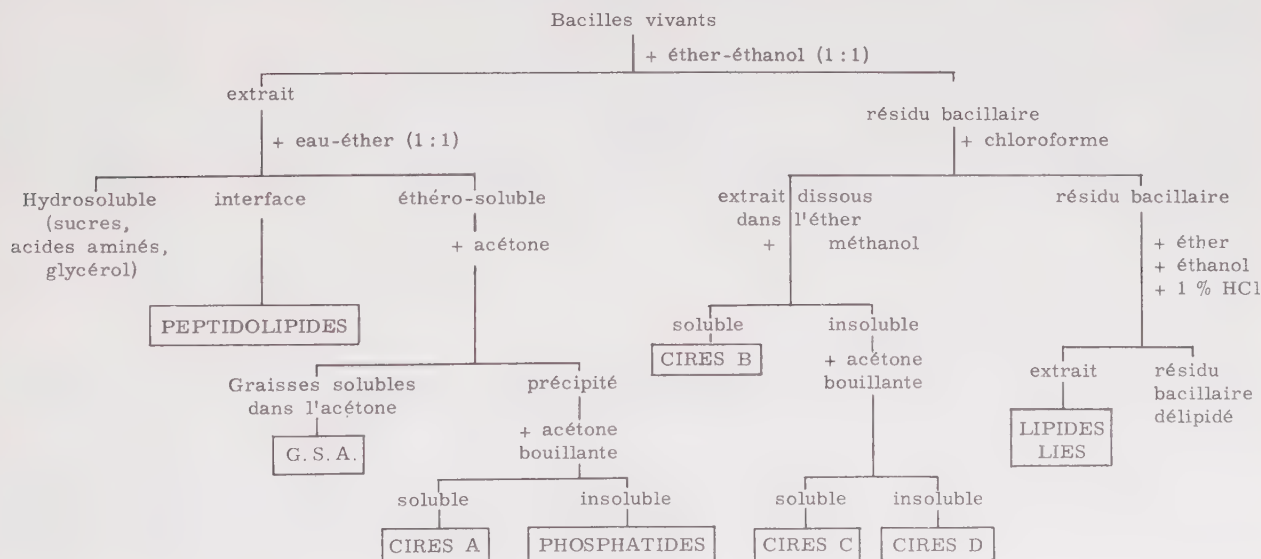
Un peptidolipide, que nous appelons peptidolipine NA, a été obtenu par distribution à contre courant à partir d'une fraction peptidolipidique brute extraite de *Nocardia asteroides*.

I - ISOLEMENT DE PEPTIDOLIPIDES

La souche de *Nocardia asteroides* ATCC 9969 est cultivée sur milieu de Sauton pendant quatre semaines (soit à l'Institut Pasteur de Paris, soit à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles à Gif-sur-Yvette). Le mycelium est filtré, lavé à l'eau, puis épuisé successivement par le mélange alcool-éther (1:1) et par le chloroforme selon la méthode d'Anderson (77). Cette extraction fournit 43 % de lipides libres totaux (13).

L'extrait éthéro-alcoolique, après évaporation du solvant, est repris par un mélange éther-eau (1:1). Une fraction insoluble dans les deux phases reste à l'interface, elle est séparée, lavée par l'éther et par l'eau, puis séchée sous vide. Elle représente 5,5 % du mycélium, soit 12,7 % des lipides libres totaux. C'est un mélange de peptidolipides. Les extraits étherés et chloroformiques sont fractionnés par précipitation par l'acétone et le méthanol selon Anderson et Asselineau (78). Le mode opératoire est schématisé dans le tableau 1. Le tableau 2 résume l'ensemble des résultats.

Tableau 1
Extraction des lipides de *Nocardia asteroides* ATCC 9969.



• Tableau 2

Lipides extraits de *Nocardia asteroides* ATCC 9969 (13)

Fractions lipidiques	% du poids sec des bacilles
Lipides extraits à l'alcool-éther (1:1)	37,2
G.S.A.	30,4
Cires A et Phosphatides	1,3
Peptidolipides	5,5
Lipides extraits au chloroforme	6,1
Cires B	0,3
Cires C	4,7
Cires D	1,1
Lipides libres totaux	43,3
Lipides liés	7,3

II - ANALYSE DES PEPTIDOLIPIDES

Le produit brut est dissous dans le chloroforme, filtré sur filtre Seitz, puis sur colonne de poudre de cellulose (79) afin d'éliminer les aminoacides libres éventuellement présents. Après évaporation du solvant, on obtient une substance jaune pâle que l'on purifie par chromatographie sur colonne d'acide silicique Mallinckrodt. Cette méthode s'est en effet révélée efficace pour la séparation d'autres lipides azotés des mycobactéries (80). Une seule fraction principale est éluee par le chloroforme contenant 5 % de méthanol. Elle se présente sous l'aspect d'une poudre incolore, $F : 220^\circ [\alpha]_D = +44,5^\circ$ (CHCl_3 , $c = 3,19$).

1/ Composition.

L'analyse élémentaire donne : % C 61,40 H 9,28 N 10,12 O-CH₃O.

La recherche du phosphore, du soufre et des halogènes est négative. L'hydrolyse acide scinde le produit en deux parties l'une lipidique éthérosoluble, l'autre hydrosoluble.

La partie éthérosoluble représente 30 % du composé initial. Elle est exempte d'azote et possède une acidité titrable par la potasse méthanolique.

Sur la partie hydrosoluble nous avons recherché le glycérol, l'inositol, les sucres et les acides aminés. Pour le glycérol, nous avons utilisé les réactions colorées de Denigès après oxydation à l'eau de brome (81) et la chromatographie sur papier selon Gordon et coll. (82) ; pour l'inositol, l'essai à la touche sur papier avec révélation par la réaction de Scherer-Gallois, selon Fleury et coll. (83). Les résultats sont négatifs.

La recherche des sucres sur un hydrolysats sulfurique par essai à la touche et révélation au phtalate acide d'aniline ainsi que par réaction avec le chlorure de triphényl tétrazolium (84) est également négative. Nous avons confirmé ce résultat après hydrolyses répétées selon Mac Lennan (85). Les hydrolysats chromatographiés sur papier et révélés au phtalate d'aniline ne présentent aucune trace de sucre. D'autre part, le dosage des groupements O-CH₃ donne une valeur nulle ce qui exclut la présence d'oses O-méthylés.

La réaction des acides aminés par essai à la touche et révélation à la ninhydrine est par contre fortement positive.

2/ Etude qualitative des acides aminés.

La nature des acides aminés a été déterminée par chromatographies sur papier, par des réactions spécifiques et par identification des DNP dérivés.

A - Chromatographies sur papier. Une première chromatographie bidimensionnelle avec deux systèmes de solvants différents, butanol - acide formique - eau (75:15:10) et phénol-eau (80:20) permet de déceler cinq spots révélabes à la ninhydrine. Les R_f correspondent à ceux des acides aminés suivants : thréonine, alanine, valine, proline, leucine et isoleucine. Une autre tache de faible intensité semble correspondre à la tyrosine. Les R_f sont donnés dans le tableau 3.

Tableau 3

R_f des acides aminés dans les systèmes de solvants I et II

Acide aminé	Système I	Système II
Thréonine	0,20	0,36
Alanine	0,28	0,49
Proline	0,32	0,87
Valine	0,54	0,67
Isoleucine	0,68	0,75
Système I = butanol-acide formique-eau (75:15:10)		
Système II = Phénol-eau (80:20)		

Une seconde chromatographie bidimensionnelle avec les systèmes butanol-acide acétique-eau (4:1:5) et butanol¹-méthyl éthyl cétone-eau-ammoniacque 17 N (5:3:1:1) (86) indique la présence des mêmes aminoacides. Les R_f par rapport à la leucine (= R_{leu}) sont indiqués dans le tableau 4.

Tableau 4

R_{leu} des acides aminés dans les systèmes de solvants III et IV

Acide aminé	Système III	Système IV
Thréonine	0,31	0,86
Alanine	0,42	0,21
Proline	0,46	0,30
Valine	0,73	0,53
Isoleucine	0,91	0,87
Leucine	1	1
Système III = butanol-acide acétique-eau (4:1:5)		
Système IV = butanol-méthyl éthyl cétone-eau-ammoniacque 17 N (5:3:1:1)		

La nature de certains acides aminés est confirmée par chromatographie monodimensionnelle dans plusieurs solvants. Une chromatographie préparative est effectuée dans butanol - acide formique - eau (75:15:10). On élue trois bandes : 1 au niveau de la thréonine, 2 au niveau de l'alanine et de la proline, 3 au niveau de la leucine et de l'isoleucine.

L'éluat n° 1 est chromatographié dans le phénol tamponné à pH 10 selon Mac Farren (87) en présence du mélange témoin suivant : acide aspartique, acide glutamique, sérine, glycocolle, thréonine et alanine. On identifie la thréonine. Les R_f sont donnés dans le tableau 5.

L'éluat n° 2 est chromatographié dans le phénol tamponné à pH 4 (87) en présence du mélange alanine, proline, tyrosine. On identifie l'alanine R_f = 0,38 et la proline, R_f = 0,75.

L'éluat n° 3 est chromatographié dans le butanol à pH 4 (87) en présence du mélange témoin : leucine, isoleucine. L'isoleucine en forte proportion est accompagnée d'une quantité beaucoup plus faible de leucine. Une chromatographie dans l'alcool amylique tertiaire saturé d'eau en atmosphère de diéthylamine (88) confirme la présence prépondérante de l'isoleucine par rapport à la leucine. Nous avons précisé qu'il s'agit en fait d'*allo*-isoleucine en effectuant une chromatographie sur papier avec un solvant spécifique. La phase supérieure du mélange alcool amylique tertiaire-acide acétique-eau (20:1:20) permet la séparation des trois acides aminés leucine, isoleucine, *allo*-isoleucine (89). L'éluat n° 3 est constitué d'*allo*-isoleucine et de traces de leucine. Les R_f par rapport à la leucine (= R_{leu}) sont donnés dans le tableau 6.

Tableau 5

R_F des acides aminés dans le système de solvants V

Acide aminé	Système V
Acide aspartique	0,13
Acide glutamique	0,24
Sérine	0,31
Glycocolle	0,38
Thréonine	0,47
Alanine	0,60
Eluat n° 1	0,45
Système V : phénol tamponné à pH 10	

Tableau 6

R_{Leu} des acides aminés du groupe de la leucine dans le système de solvants VI

Acide aminé	Système VI
Leucine	1
<i>allo</i> -Isoleucine	0,83
Isoleucine	0,91
Eluat n° 3	0,83
Système VI = alcool amylique tertiaire - acide acétique - eau (20:1:20)	

B - Réactions spécifiques. La présence de thréonine est confirmée par chromatographie monodimensionnelle et révélation par immersion du chromatogramme dans une solution de périodate, puis de benzidine, réactif spécifique des α -glycols et des α -aminoalcools (90) (82).

La proline est identifiée par sa réaction positive à l'isatine (91). Nous avons recherché la tyrosine par le réactif de Pauly (92) et par le réactif d'Acher et Croker (93). Ces deux réactions sont négatives. D'autre part, le spectre ultra-violet d'un hydrolysate des peptidolipides ne présente aucun maximum à 275 m μ ce qui exclut la présence d'un cycle aromatique. Nous avons cherché à préciser la nature de l'acide aminé que nous avons identifié à la tyrosine. Nous l'avons obtenu par chromatographie préparative dans butanol-acide acétique-eau (4:1:5). Les R_F de cet acide aminé sont voisins de ceux des acides aminobutyriques ; nous l'avons donc soumis à des chromatographies dans différents solvants en présence des témoins suivants : acide α -aminobutyrique, acide α -aminoisobutyrique, acide β -aminobutyrique, acide γ -aminobutyrique. Il se différencie nettement des acides β et γ -aminobutyriques dans phénol-eau (80:20) tandis qu'il s'identifie à l'acide α -aminobutyrique dans ce même solvant et dans butanol-éthanol-eau-acide propionique (10:10:5:2) (94), qui sépare parfaitement les acides α -aminobutyrique et α -aminoisobutyrique. Les R_F sont indiqués dans les tableaux 7 et 8.

L'acide α -aminobutyrique est assez rare dans les produits naturels. On le trouve dans certains métabolites microbiens. On l'a isolé par exemple de *Escherichia coli* et de *Corynebacterium diphtheriae* (95) (88), ainsi que de *Penicillium islandicum* (96) (97). Il entre dans la composition de la staphylomycine S (74) et de l'ostrogrycine B (73).

Tableau 7

R_F des acides aminobutyriques dans le système de solvants II

Acide aminé	Système II
Acide α -aminobutyrique	0,61
Acide α -amino-isobutyrique	0,65
Acide β -aminobutyrique	0,71
Acide γ -aminobutyrique	0,74
Acide inconnu	0,61
Système II = phénol-eau (80:20)	

Tableau 8

R_F des acides aminobutyriques par rapport à l'acide α -amino-isobutyrique dans le système de solvants VII

Acide aminé	Système VII
Acide α -aminobutyrique	0,88
Acide α -amino-isobutyrique	1
Acide inconnu	0,88
Système VII = butanol-éthanol-eau-acide propionique (10:10:5:2)	

C - Identification des DNP dérivés. Après chromatographie préparative et élution de chacun des aminoacides, nous avons préparé les DNP dérivés correspondants. Par chromatographie ascendante dans toluène-chloroéthanol-pyridine-ammoniaque 0,8 N (5:3:1,5:3) (98) en présence des DNP dérivés témoins synthétiques (99) on identifie DNP-*allo*-isoleucine (R_F = 0,42), DNP thréonine (R_F = 0,15) et DNP valine (R_F = 0,34). La DNP alanine et la DNP proline ne sont pas séparées dans ce solvant. Elles sont identifiées par chromatographie descendante dans un tampon phosphate 1,5 M pH 6 (100).

De cette étude qualitative, il résulte que la fraction peptidique des peptidolipides de *Nocardia asteroides* renferme sept acides aminés différents : thréonine, alanine, proline, acide α -aminobutyrique, valine, *allo*-isoleucine et leucine.

3/ Etude quantitative des acides aminés.

Une analyse quantitative est effectuée par chromatographie sur résine de Dowex 50 X 4 (101) et dosage des acides aminés par la ninhydrine selon Moore et Stein (102) et selon Chinard pour la proline (103). La figure 1 représente les colorations obtenues. Elle conduit aux proportions suivantes : Ala₄, *allo*-Ileu₂, Pro₃, Thr₄, Val₃. La leucine et l'acide α -aminobutyrique sont en proportion beaucoup plus faible. Il est vraisemblable qu'il s'agit d'impuretés ou bien qu'ils remplacent en partie respectivement l'isoleucine et la valine dans la chaîne peptidique.

La présence de ces deux acides aminés laisse supposer l'hétérogénéité de la fraction peptidolipidique. Nous avons cherché à la purifier.

III - ETUDE CHROMATOGRAPHIQUE DES PEPTIDOLIPIDES

Lors des essais de purification, nous nous sommes heurtés à un problème assez délicat : l'établissement d'un critère d'homogénéité des substances isolées. Il est facile de prévoir et les résultats ont confirmé cette hypothèse, que les différents composés, tous de nature peptidolipidique et sans doute de structures voisines ont des caractéristiques semblables : analyse élémentaire, pouvoir rotatoire, point de fusion, poids moléculaire. Il a donc été nécessaire de rechercher une autre preuve d'homogénéité. Nous avons effectué sur chaque fraction obtenue après purification, l'analyse quantitative des acides aminés en précisant également les proportions des formes D et L,

ce qui a permis d'établir la formule brute de la partie peptidique. Lorsque le poids moléculaire calculé à partir de cette formule brute est supérieur au poids moléculaire trouvé expérimentalement, on a affaire à un mélange de composés différant entre eux par les proportions relatives des acides aminés. Ce critère nous a permis de vérifier l'efficacité des fractionnements.

1/ Chromatographie sur trisilicate de magnésium.

Le trisilicate de magnésium sépare les peptidolipides en deux fractions : la fraction I éluée par le chloroforme (70 % du produit initial) et la fraction II éluée par le chloroforme contenant 5 % de méthanol (30 % du produit initial). Ces deux fractions ont une analyse élémentaire et des caractéristiques physiques sensiblement identiques (tableau 9).

Tableau 9

Analyse élémentaire et caractéristiques physiques
des fractions chromatographiques I et II

Fractions	C %	H %	N %	$[\alpha]_D$	F	P. M.
I	61,68 61,42	9,50 9,26	9,71	38,2°	220°	1400-1480
II	62,01 61,51	9,84 9,51	10,13	39°	215°	

Le poids moléculaire a été déterminé par la micro-méthode de Barger (104) modifiée par Rast (105).

Nous avons en premier lieu cherché la configuration D ou L des acides aminés des deux fractions chromatographiques I et II.

A - Etude microbiologique et enzymatique. Cette étude a été effectuée par le Dr. M. Ikawa et le Dr. E.E. Snell (Université de Californie) (106) (107). Les hydrolysats des fractions I et II sont chromatographiés sur une colonne de Dowex 50 en vue de séparer et de recueillir les différents aminoacides. La pureté de chaque fraction est contrôlée par chromatographie sur papier. La configuration optique est ensuite déterminée soit par action de la D-aminoacide oxydase, soit en utili-

Tableau 10

Etude microbiologique des acides aminés des fractions chromatographiques I et II

Acide aminé	Configuration optique	Méthode d'analyse	Proportions molaires en micromoles	
			Fraction I	Fraction II
Thréonine	D + L	Ninhydrine	32,7	34,2
	L	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	34,8	35,0
Alanine	D + L	Ninhydrine	31,5	36,5
	D + L	<i>Leuconostoc citrovorum</i>	29,6	32,0
	D	D-aminoacide oxydase	20,9	19,9
Valine	L	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	27,3	25,0
	D	D-aminoacide oxydase	1,3	0,7
Ammoniac		Réactif de Nessler	7,2	7,7
Proline	D + L	Ninhydrine	17,25	17,25
	L	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	16,2	16,8
Leucine + Isoleucine + <i>allo</i> -Isoleucine	D + L	Ninhydrine	19,9	19,8
	D	D-aminoacide oxydase	16,4	16,3
Leucine	L	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1	1
Isoleucine	L	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1,0	0,9

sant des microorganismes pour lesquels l'acide aminé est un facteur de croissance. Les résultats de cette analyse sont exposés dans le tableau 10. La valine est accompagnée d'acide α -aminobutyrique probablement sous forme L puisqu'il ne donne pas de cétoacide après traitement avec la D-aminoacide oxydase.

Plusieurs conclusions ressortent de ces résultats :

En premier lieu, la détermination quantitative des formes D et L des acides aminés indique une identité totale de composition entre les fractions I et II. Il n'y a donc aucun fractionnement lors de la chromatographie ; l'élution partielle de la fraction I par le chloroforme s'explique sans doute par une saturation en peptidolipides de la colonne de trisilicate de magnésium. Par conséquent, les essais ultérieurs porteront uniquement sur la fraction II élue par le chloroforme contenant 5 % de méthanol.

On peut établir les proportions molaires des différents acides aminés : si l'on considère en première approximation que la totalité de l'*allo*-isoleucine et les deux tiers de l'alanine sont sous la forme D on arrive à la formule brute de la partie peptidique : D-Ala₂, L-Ala₁, D-*allo*-Ileu₂, L-Pro₂, L-Thr₄, L-Val₃.

Une constatation intéressante est la présence d'acide aminé de configuration D, composés assez inhabituels dans les produits naturels, sauf chez les microorganismes. La D-alanine se trouve dans les parois cellulaires et les spores des bactéries. Chez *Streptococcus faecalis* elle est formée à partir de la L-alanine grâce à l'alanine racémase (108) mais quelques bactéries exigent une source exogène de D-alanine particulièrement sur un milieu dépourvu de pyridoxine. La D-alanine entre dans la composition de deux mucopeptides extraits des parois cellulaires d'*Escherichia coli* par action du lysozyme (109). On la trouve également dans les cires D des mycobactéries (110) dans les mycosides C (111) (112) (106) et dans les acides teichoïques (113). Quant à la D-*allo*-isoleucine, elle est très rare dans les produits naturels ; on ne l'a identifiée jusqu'à présent que dans les actinomycines C, antibiotiques isolés de *Streptomyces antibioticus* et *Streptomyces chrysomallus* (64) et dans le sporidesmolide II, depsipeptide isolé de *Pithomyces chartarum* (56).

B - Analyse quantitative des acides aminés. Un hydrolysat chlorhydrique de la fraction II a été analysé par chromatographie sur colonne d'Amberlite CG 120 (114). Ce dosage donne les proportions suivantes d'acides aminés : Ala₄, *allo*-Ileu₂, Pro₂, Thr₄, Val₃.

Les proportions molaires des acides aminés sont voisines de celles qui ont été obtenues précédemment pour les peptidolipides bruts et, par la méthode microbiologique, pour les fractions I et II. La formule brute approchée de la partie peptidique : D-Ala₂, L-Ala₁, D-*allo*-Ileu₂, L-Pro₂, L-Thr₄, L-Val₃, correspond à un peptide de poids moléculaire 1352 et conduit avec une proportion de 30 % de partie lipidique à un poids moléculaire de 1930 pour les peptidolipides, supérieur à celui qui est trouvé expérimentalement (Voir tableau 9 p. 26).

2/ Autres chromatographies.

Nous avons effectué de nouveaux essais de fractionnement par chromatographies répétées sur trisilicate de magnésium puis sur alumine. Nous avons utilisé également la chromatographie de partage sur colonne de célite imprégnée de la phase aqueuse du solvant butanol-éthanol-eau (5:4:1), la phase alcoolique constituant l'éluant. Dans tous les cas les résultats ont été décevants, aucune séparation n'a été possible. Nous avons alors abandonné la chromatographie pour rechercher un autre mode de fractionnement et nous avons utilisé la distribution à contre courant.

IV - PURIFICATION DE LA PEPTIDOLIPINE NA PAR CONTRE COURANT

Nous avons mis au point les conditions optimales pour un fractionnement efficace et nous avons adopté deux systèmes de solvants qui nous ont permis d'isoler un peptidolipide homogène, la peptidolipine NA.

1/ Recherche des conditions optimales.

A - Solvants. Rappelons que le coefficient de partage K_A d'une substance A dans deux solvants non miscibles est le rapport p_A/q_A , p_A étant la quantité de substance dissoute dans la phase supérieure, q_A la quantité de substance dissoute dans le même volume de phase inférieure. La séparation par contre courant d'un mélange de deux constituants A et B est possible lorsque leurs coefficients K_A et K_B sont différents ; elle est optimale lorsque $K_A \times K_B = 1$. Le système de solvant est donc choisi de telle sorte que le coefficient moyen du mélange K soit voisin de l'unité (115).

Nous avons testé la solubilité des peptidolipides dans plusieurs systèmes de solvants déjà utilisés en contre courant (116) et nous avons déterminé la valeur de K pour chacun d'eux. L'insolubilité des peptidolipides dans les phases aqueuses nous a conduit à éliminer les systèmes qui contenaient une trop forte proportion d'eau.

Le tableau 11 schématise ces résultats.

Tableau 11

Valeurs du coefficient K des peptidolipides dans quelques systèmes de solvant.

CH ₃ COOH 90 %	Alcool Isopropylique	Cyclohexane	Hexane	CHCl ₃	CCl ₄	C ₆ H ₆	MeOH	H ₂ O	p	q	K
-	-	-	-	-	-	3	2	0,3	29	71	0,41
-	-	-	-	-	2	1	2	0,3	14	86	0,16
-	-	-	-	-	1,2	2,5	2,2	0,3	21	79	0,27
-	-	-	-	0,25	-	3	2	0,3	23	77	0,30
-	-	-	-	0,5	-	2,7	2	0,3	26	74	0,35
-	-	-	-	-	6,2	-	3,5	0,3	28	72	0,39
-	-	-	3,1	-	2,8	-	4,1	0,3	60	40	1,5
-	-	-	3,1	-	4,5	-	3,1	0,3	58	42	1,4
-	-	-	3,1	-	3,1	-	3,5	0,3	56	44	1,3
-	-	-	3,1	-	3,1	-	3,8	0,3	53	47	1,1
-	-	-	2,2	-	4	-	3,8	0,3	46	54	0,85
-	-	-	2	-	4,2	-	3,8	0,3	43	57	0,75
-	0,35	-	-	-	-	3,25	2	0,4	17	83	0,20
-	0,5	-	-	-	-	3,5	2	0,4	27	73	0,37
1	-	1	-	-	-	-	-	-	30	70	0,43
4	-	3	-	-	-	1	-	-	60	40	1,5
5	-	4	-	-	-	1	-	-	51	49	1

Trois systèmes de solvants sont à retenir car ils correspondent à un coefficient de partage voisin de l'unité.

Système A : hexane-tétrachlorure de carbone-méthanol-eau (3,1:3,1:3,8:0,3).

Système B : hexane-tétrachlorure de carbone-méthanol-eau (2,2:4,0:3,8:0,3).

Système C : benzène-cyclohexane-acide acétique 90 % (1:4:5).

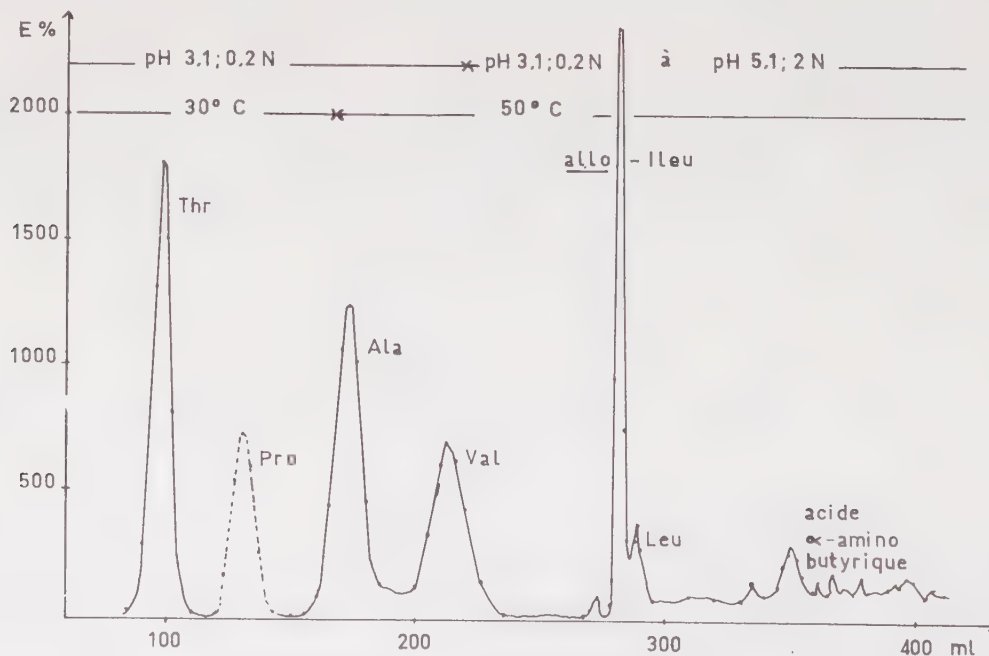


Figure 1 - Chromatographie d'un hydrolysât de peptidolipides, sur Dowex 50 X 4.

Les premiers essais de répartition à contre courant nous ont fait éliminer le système C. Le produit recueilli après évaporation des solvants est brun et le point de fusion nettement inférieur à celui du produit initial.

L'acide acétique hydrolyse sans doute partiellement les peptidolipides au cours des essais et ce système acide est incompatible avec la fragilité des produits étudiés. Le choix est donc limité aux systèmes A et B qui ne diffèrent que par le pourcentage des constituants.

B - Nombre de transferts. L'appareil utilisé permet d'effectuer une série fondamentale de 119 transferts. Dans ces conditions, une première distribution des peptidolipides avec le système A, ne conduit pas à une véritable séparation.

Pour les essais suivants la série fondamentale a été complétée par une série de retraits de la phase supérieure : celle-ci est recueillie lorsqu'elle atteint le dernier tube de l'appareil, tandis que le premier tube est alimenté avec la phase supérieure neuve comme à chacun des transferts précédents. Le cycle des opérations peut ainsi continuer et l'on prélève successivement les phases supérieures s numérotées 1, 2, 3, etc. Le coefficient de partage d'un composé recueilli dans cette série de retraits est donné par la relation $K = \frac{m}{s_{\max}}$ où m est le nombre de transferts de la série fondamentale et $s_{\max}$ le numéro de la phase supérieure renfermant le maximum de substance. Lorsque $s = m$, les fractions prélevées renferment les produits qui ont des coefficients de partage $K \geq 1$. Nous constaterons que la fraction peptidolipidique principale a un coefficient de partage supérieur à 1 dans les solvants choisis. Dès qu'elle est extraite avec les phases supérieures, il est inutile de continuer le fractionnement et le nombre de transferts se trouve ainsi limité.

Nous avons adopté une série de 120 retraits de phase à la suite de la série fondamentale avec le système A, et une série de 210 retraits de phase avec le système B.

C - Interprétation des résultats. On trace la courbe de distribution expérimentale, c'est-à-dire la courbe de poids du produit en fonction du numéro de la fraction.

La courbe de distribution théorique d'une substance pure est une courbe de Gauss. La courbe de distribution expérimentale de plusieurs composés qui possèdent des coefficients de partage voisins est la somme des différentes courbes théoriques individuelles.

La position des peptidolipides est donc précisée sur tous les diagrammes expérimentaux par le tracé des courbes théoriques correspondantes (117). Cette interprétation est délicate, la position des courbes de Gauss étant assez arbitraire. Cependant, quand la substance analysée est homogène, on constate une bonne coïncidence entre les courbes théorique et expérimentale. La pureté du produit est ensuite confirmée par la détermination complète de sa structure.

2/ Fractionnement des peptidolipides par contre courant.

La fraction peptidolipidique brute est chromatographiée sur colonne d'acide silicique Mallinckrodt. La partie éluée par le chloroforme contenant 5 % de méthanol est soumise au fractionnement par contre courant.

A - Système de solvants A. Essai n° 1. Figure 2. Le produit est presque entièrement récupéré dans la série de retraits des phases supérieures. Les coefficients de partage des différents constituants sont donc supérieurs à l'unité. On peut admettre l'existence de deux composés.

- Les fractions 55 à 85 qui représentent le constituant principal, soit 48 % du produit initial, sont réunies. Le produit obtenu est étudié et ses propriétés comparées à celles du mélange. $F = 236-237^\circ [\alpha]_D = + 38^\circ$ (CHCl_3 , $c = 3,17$). Le poids moléculaire déterminé par la micro-méthode de Barger-Rast est de 1100. Le dosage des acides aminés conduit, pour la partie peptidique, à la formule brute suivante : Ala_2 , *allo*-Ileu₁, Pro₁, Thr₂, Val₁, soit à un poids moléculaire de 671 pour le peptide et de 960 pour le peptidolipide (avec 30 % de partie lipidique) ce qui est en accord avec la valeur expérimentale. Les propriétés de ce produit diffèrent donc sensiblement de celles du mélange initial : point de fusion plus élevé, poids moléculaire plus faible, rapport molaire des acides aminés plus simple.

- Les fractions 90 à 129 de la série de retraits renferment sans doute un mélange. L'allure très aplatie de la courbe ne permet pas de préciser le nombre des constituants.

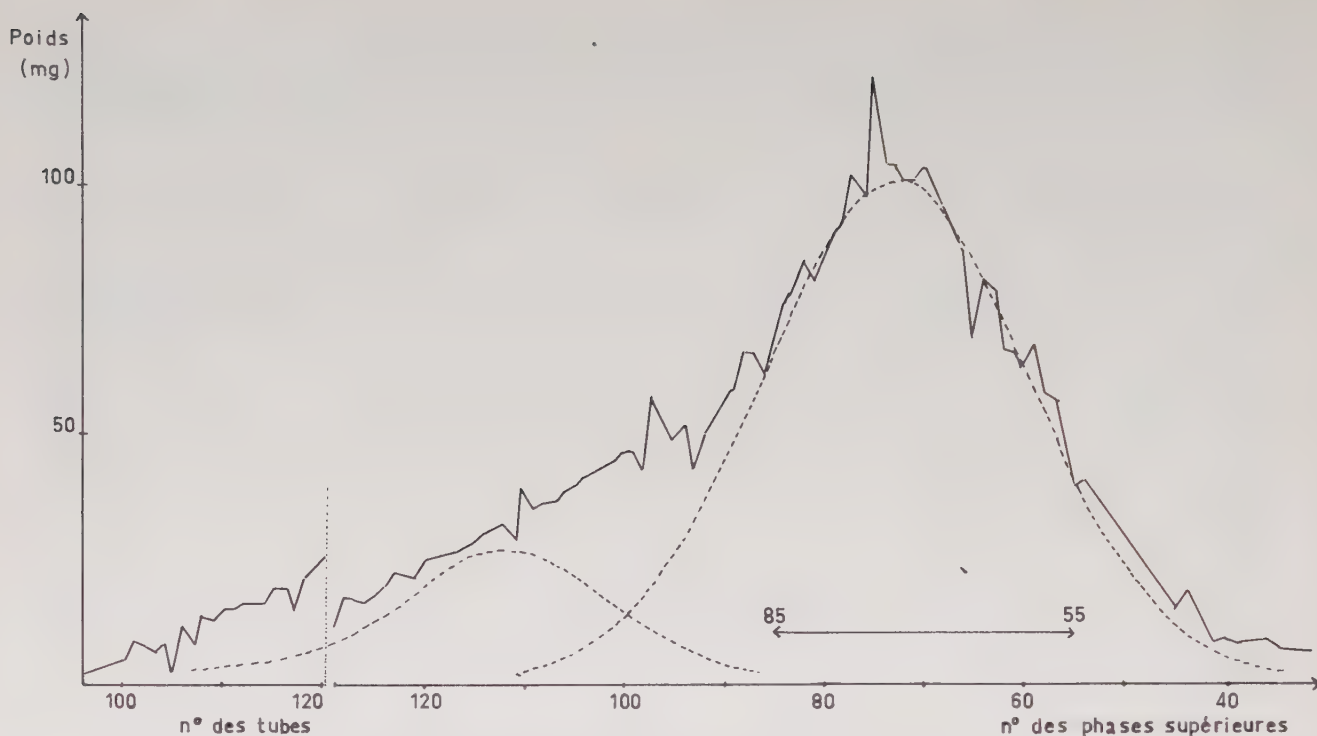


Figure 2 - Fractionnement des peptidolipides par contre-courant.
Essai n° 1 (5,086 g) ——— courbe expérimentale, - - - - courbe théorique.

- Essai n° 2. Figure 3. Les fractions 55 à 85 de l'essai n° 1 sont soumises à une nouvelle séparation. On peut placer une seule courbe de Gauss dans la courbe expérimentale et considérer le produit testé comme homogène. Pour le vérifier, nous avons étudié comparativement les trois fractions 63, 74 et 84. Leurs propriétés sont indiquées dans le tableau 12.

Tableau 12

Propriétés des fractions 63, 74 et 84 obtenues par contre courant (essai n° 2)

Fraction	F	$[\alpha]_D$	C %	H %	N %	P.M.
63	240-242°	+ 45°	59,75	9,31	9,77	1115
74	240-241°	+ 42°	60,29	9,38	10,18	
84	238-240°	+ 38°	60,23	9,32	9,70	

Les acides aminés ont été dosés après hydrolyses chlorhydriques de 46 heures. Le résultat est donné dans le tableau 13.

Tableau 13

Analyse quantitative des acides aminés
des fractions 63, 74 et 84 obtenues par contre courant (essai n° 2)

Acide aminé	Proportions molaires		
	63	74	84
Thr	2	2	2
Ala	2	2	2
Val	1	1	1
allo-Ileu	1	1	1
Pro	1	1	1

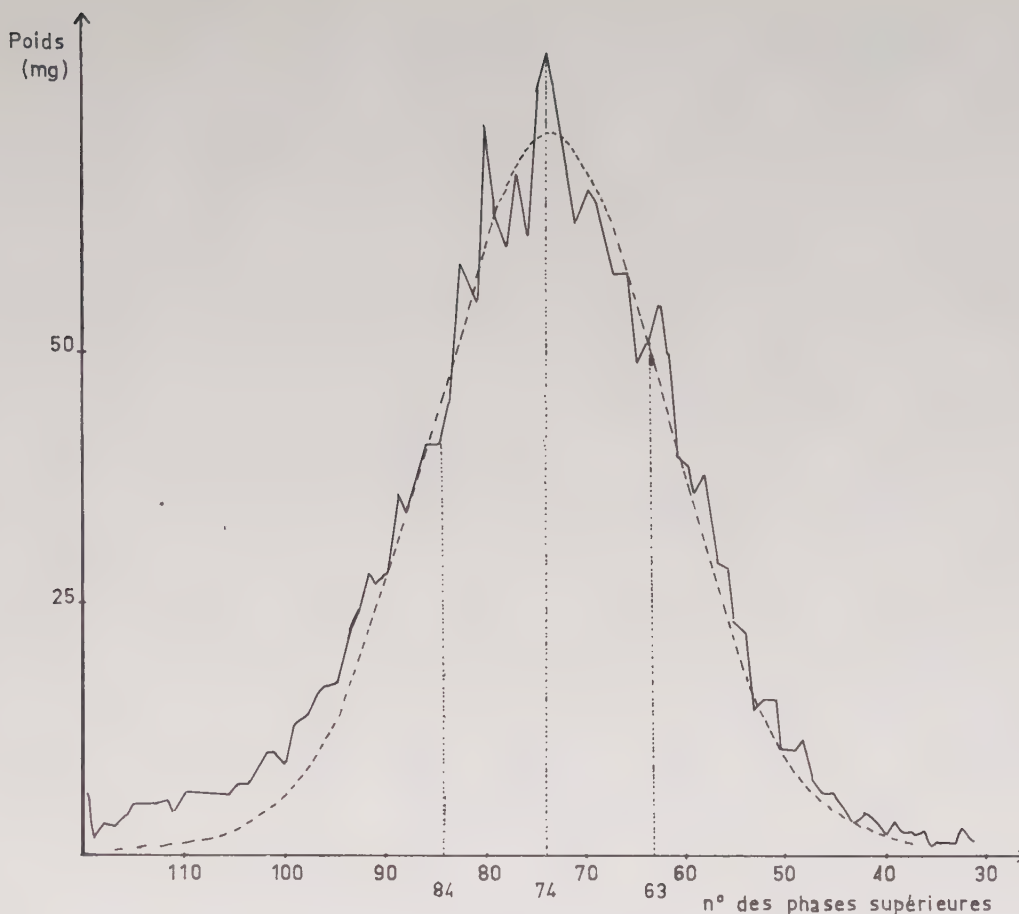


Figure 3 - Fractionnement des peptidolipides par contre-courant.
Essai n° 2 (2,446 g).

Les trois fractions étudiées ont les mêmes caractéristiques et donnent la même analyse élémentaire.

Par conséquent, la répartition par contre courant dans le système de solvants A a fractionné le mélange de peptidolipides et permis d'obtenir un produit homogène. Le coefficient de partage est $K = \frac{119}{74} = 1,6$.

B - Système desolvants B. Essai n° 3. Figure 4. Ce système de solvants à l'avantage de permettre un nombre plus élevé de transferts étant donné la plus grande solubilité du produit initial dans la phase inférieure (K moyen = 0,85, cf. tableau 11 p. 28).

Comme dans l'essai n° 1 la courbe expérimentale est dissymétrique mais, pour les fractions 80 à 100 de la série de retraits, elle est pratiquement identique à la courbe de Gauss théorique correspondant au composé principal. Ce système donne donc une meilleure séparation et nous l'avons adopté pour préparer la peptidolipine NA.

Les fractions correspondant au pic principal de trois essais analogues au n° 3 sont réunies et chromatographiées sur acide silicique Mallinckrodt. Le produit élué par le chloroforme contenant 5 % de méthanol est soumis à une nouvelle répartition à contre courant (figure 5). La courbe expérimentale et la courbe théorique sont pratiquement confondues mais cette nouvelle distribution permet d'éliminer environ 10 % d'impuretés correspondant aux fractions extrêmes.

Les fractions 81 à 125 de la série de retraits qui représentent la partie centrale de la courbe, $K = 1,1$, sont réunies et soumises à une dernière chromatographie sur acide silicique Mallinckrodt. La substance éluée par le chloroforme contenant 5 % de méthanol est reprise par le minimum de chloroforme et reprécipitée par addition d'éther.

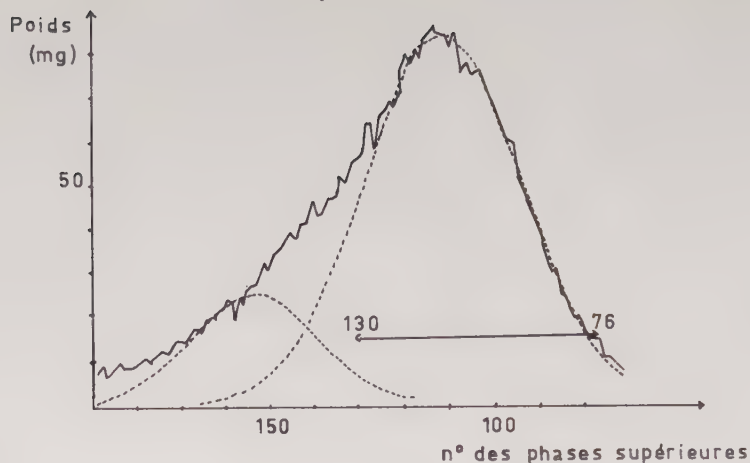


Figure 4 - Fractionnement des peptidolipides par contre-courant.
Essai n° 3 (5,112 g).

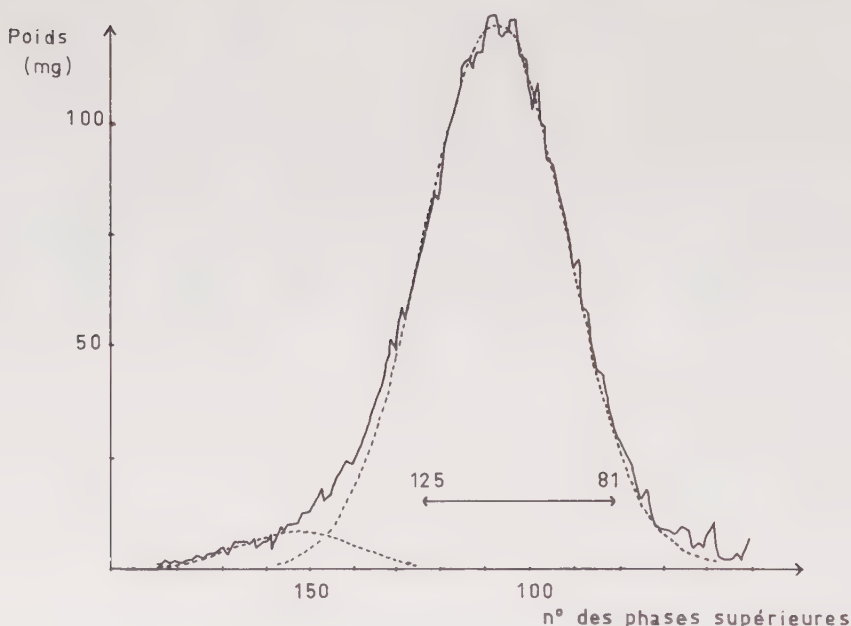


Figure 5 - Fractionnement des peptidolipides par contre-courant.
Essai n° 4 (5,515 g).

Le précipité est décanté, lavé plusieurs fois à l'éther, séché sous vide à 110° puis à 135° en présence de P_2O_5 . C'est la peptidolipine NA.

3/ Caractéristiques de la peptidolipine NA.

C'est une poudre incolore. $F\ 232-233^\circ$ $[\alpha]_D = +42,7^\circ$ ($CHCl_3$, $c = 3,39$).

La peptidolipine NA est très soluble dans le chloroforme, l'acide acétique, le butanol, la pyridine, la méthyl éthyl cétone, le tétrahydrofuranne.

Elle est soluble dans l'alcool absolu, le méthanol, l'alcool amylique tertiaire, l'alcool butylique tertiaire, l'alcool isopropylique et le dioxanne. Elle est peu soluble dans le benzène et l'acétate d'éthyle, et elle est totalement insoluble dans l'eau, l'hexane, le cyclohexane, l'isooctane et le tétrachlorure de carbone. Elle a une acidité nulle et elle ne réagit pas à la ninhydrine ce qui indique l'absence de groupements-COOH et $-NH_2$ libres.

Le spectre ultra-violet mesuré dans l'éthanol montre un maximum à 208 mμ ($\epsilon = 12.900$).

Le spectre infrarouge dans le nujol montre les bandes de la liaison peptidique à 1530, 1640, 3080 et 3250 cm^{-1} et de la liaison ester à 1160, 1250 et 1740 cm^{-1} , (figure 6).

Après séchage sur P_2O_5 à 135° sous 0,01 mm, l'analyse élémentaire donne % C 62,28 H 9,55 N 10,21 O-CH₃ 0 CO-CH₃ 0.

Calculé pour $\text{C}_{50}\text{H}_{89}\text{N}_7\text{O}_{11}$ % C 62,27 H 9,30 N 10,17 P.M. 963.

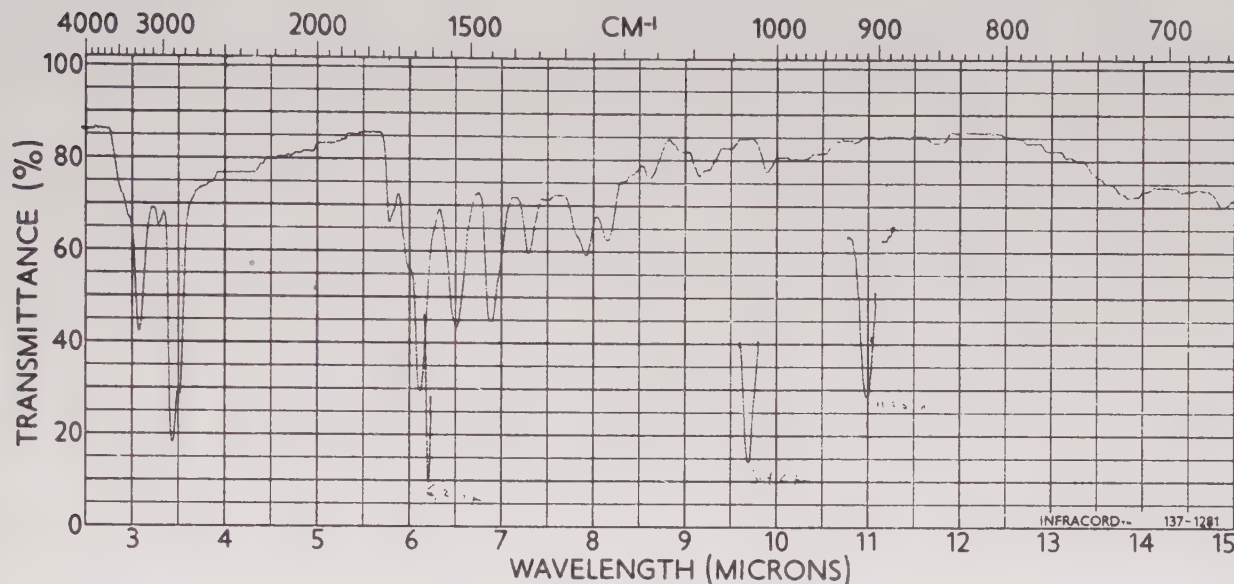


Figure 6 - Spectre infrarouge de la peptidolipine NA.

Après séchage à 110° sous 0,01 mm, l'analyse élémentaire donne :

% C	60,80	H	9,35	N	10,73
	59,84		9,20		9,84
	59,69		9,27		9,95
	60,58		9,27		9,47
	60,87		9,28		9,61

Calculé pour $\text{C}_{50}\text{H}_{89}\text{N}_7\text{O}_{11}$, H_2O % C 61,13 H 9,33 N 9,97

Calculé pour $\text{C}_{50}\text{H}_{89}\text{N}_7\text{O}_{11}$, 2 H_2O % C 60,03 H 9,37 N 9,80

Le poids moléculaire déterminé par la spectrométrie de masse est 963, correspondant exactement à la formule brute $\text{C}_{50}\text{H}_{89}\text{N}_7\text{O}_{11}$.

CHAPITRE III

ÉTUDE DE LA FRACTION PEPTIDIQUE

I - DETERMINATION DE LA FORMULE BRUTE

Un hydrolysât chlorhydrique de la peptidolipine NA est analysé sur Amberlite CG 120 (figure 7). Les aminoacides existent dans le rapport suivant : Ala₂, *allo*-Ileu₁, Pro₁, Thr₂, Val₁.

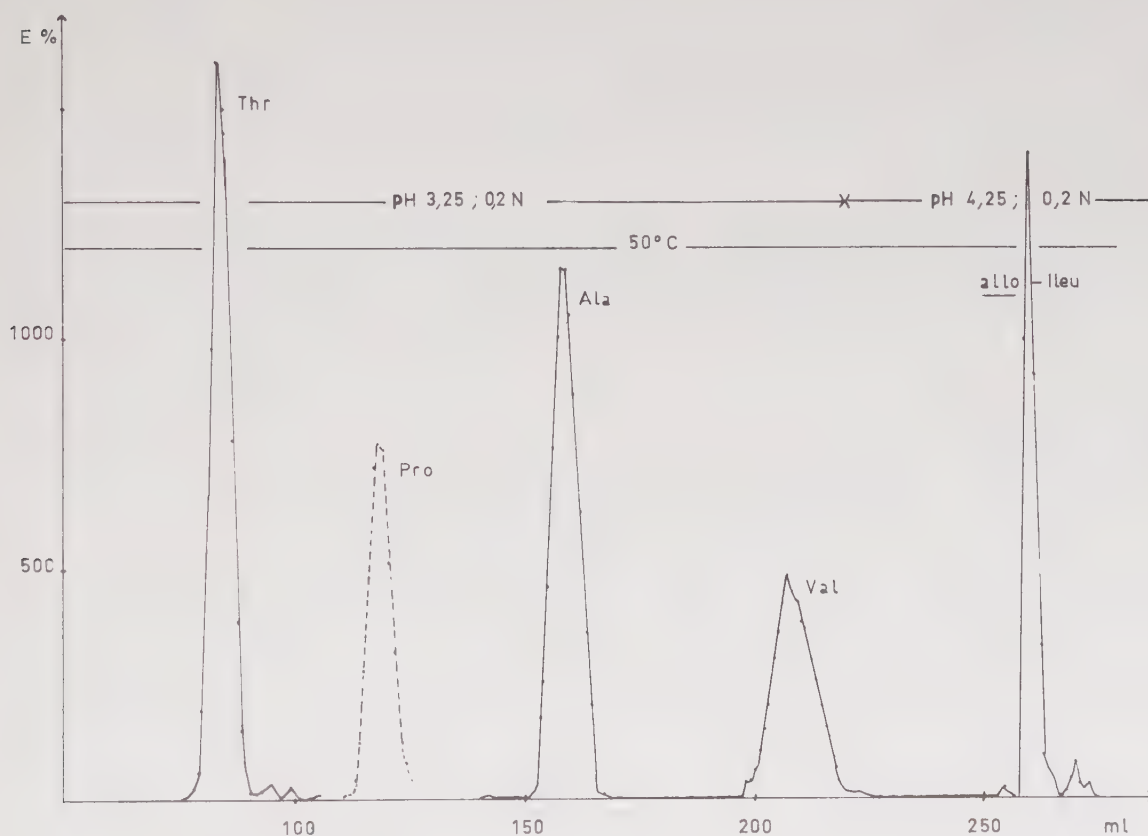


Figure 7 - Analyse quantitative des acides aminés de la peptidolipine NA, sur Amberlite CG 120.

Leur configuration optique est déterminée par étude microbiologique et enzymatique. Les résultats sont indiqués dans le tableau 14.

Ils confirment les proportions molaires trouvées par dosage sur Amberlite CG 120. La thréonine, la valine et la proline sont sous la forme L, l'*allo*-isoleucine sous la forme D et l'alanine renferme en proportions équimoléculaires les formes D et L.

Il y a donc des différences sensibles avec l'analyse des fractions chromatographiques I et II effectuées précédemment (voir pages 26 et 27).

Tableau 14

Configuration optique des amino-acides

Acide aminé	Configuration optique	Méthode d'analyse	μ moles
Thréonine	D + L	ninhydrine	57,0
	L	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> P. 60	61,5
Alanine	D + L	ninhydrine	63,3
	D	D-amino acide oxydase	32,2
Valine	L	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> P. 60	40,0
	D	D-amino acide oxydase	1,4
Proline	D + L	ninhydrine	35,1
	L	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> P. 60	30,0
<i>allo</i> -Isoleucine	D + L	ninhydrine	29,45
	D	D-amino acide oxydase	29,0
Ammoniac		Réactif de Nessler	10,7

La partie peptidique de la peptidolipine NA est un heptapeptide : D-Ala₁, L-Ala₁, D-*allo*-Ileu₁, L-Pro₁, L-Thr₂, L-Val₁.

II - DETERMINATION DE LA SEQUENCE PEPTIDIQUE

1/ Isolement de peptides.

La peptidolipine NA est soumise à une hydrolyse acide partielle dans des conditions suffisamment douces pour provoquer le minimum de coupures dans la chaîne peptidique. Nous avons utilisé un mélange à parties égales d'acide acétique glacial et d'acide chlorhydrique concentré. Plusieurs essais préliminaires ont été effectués à 37°, le temps variant de 6 heures à 6 jours. Au bout de 6 heures, la totalité de la peptidolipine NA est transformée et nous avons adopté ce temps d'hydrolyse.

Les acides acétique et chlorhydrique sont évaporés sous vide, sur KOH. Le résidu est extrait à l'eau et à l'éther. On obtient une fraction éthersoluble négligeable (3 %) et une fraction hydrosoluble qui a été étudiée.

Elle possède la propriété d'être à la fois soluble dans l'eau et dans le chloroforme, elle est donc différente de la peptidolipine NA puisque celle-ci est insoluble dans l'eau. Nous l'avons analysée par chromatographie sur papier et par chromatographie sur Dowex 50 X 2.

A - Chromatographie analytique sur papier. La chromatographie sur papier dans le solvant VIII, butanol-acide acétique-eau (65:10:25) et la révélation à la ninhydrine mettent en évidence trois taches, l'une correspondant à la thréonine et les deux autres à des peptides P et Q apparaissant en jaune puis virant au violet (j → v) de R_F : P = 0,72 et Q = 0,90. Ce dernier est prépondérant.

B - Chromatographie préparative sur Dowex 50 X 2. Elle est effectuée selon Hirs, Moore et Stein (118). Pour localiser les acides aminés ou les peptides dans les fractions recueillies, nous avons effectué des dosages à la ninhydrine selon Moore et Stein (102) après hydrolyse alcaline de parties aliquotes. La figure 8 indique les résultats. On distingue quatre constituants : I, II, III, IV qui sont isolés après élimination des sels du tampon.

Le composé I est dessalifié sur Dowex 2 selon Drège et Boeck (119) puis identifié à la thréonine par chromatographie sur papier dans le solvant VIII (R_F = 0,20, R_F de la thréonine = 0,20).

Le composé II est dessalifié sur Dowex 50 X 2 (120). C'est le peptide P (j → v) de R_F 0,72 dans le solvant VIII.

Les composés III et IV sont dessalifiés sur Dowex 50 X 2. Par chromatographie sur papier dans le solvant VIII, ils se comportent tous les deux comme le peptide Q (j → v) de R_F 0,90. On observe aussi des traces de thréonine. Celle-ci ne provient pas d'impuretés, étant donné la différence d'ordre d'élution qui existe entre les fractions I (Thr.) et III et IV (Q). Il y a probablement

libération de thréonine par hydrolyse du peptide Q au cours de la chromatographie sur résine ou de la dessalification (voir chap. V p. 62).

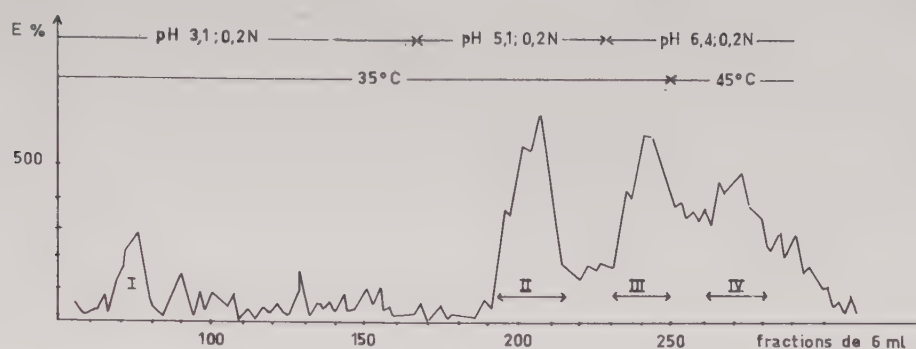


Figure 8 - Chromatographie préparative d'un hydrolysât partiel de la peptidolipine NA, sur Dowex 50 X 2.

Les deux pics III et IV correspondent à un même composé, l'apparition du pic IV peut s'expliquer par l'augmentation de la température du tampon d'élution lors de la chromatographie.

Ainsi, à partir d'un hydrolysât partiel de la peptidolipine NA, la chromatographie sur Dowex 50 X 2 permet d'isoler trois constituants décelés auparavant par chromatographie sur papier : la thréonine et les peptides P et Q. Cependant, ce dernier est obtenu avec un rendement très faible alors que l'analyse par chromatographie sur papier montre qu'il est le constituant principal. Il est vraisemblable que Q est détruit en grande partie au cours de la chromatographie sur résine. Aussi l'avons-nous obtenu en quantité plus importante par chromatographie préparative sur papier.

C - Chromatographie préparative sur papier. Elle est effectuée dans le solvant butanol-éthanol-eau (5:1:4), le peptide Q ($R_f = 0,87$) est recueilli au bas de la feuille par écoulement continu du solvant d'élution. Après évaporation de ce dernier, il est dissous dans l'eau ; la solution aqueuse est lavée à l'éther puis évaporée : la pureté du produit obtenu est contrôlée par une nouvelle chromatographie sur papier dans le solvant VIII. On observe une seule tache (j $\rightarrow$ v) de $R_f 0,9$ avec des traces de thréonine.

2/ Etude du peptide P

Avant de déterminer la structure de P, nous avons vérifié sa pureté par chromatographies sur papier dans plusieurs solvants. Une seule tache (j $\rightarrow$ v) est révélée à la ninhydrine :

$R_f = 0,72$ dans le solvant VIII butanol-acide acétique-eau (65:10:25).

$R_f = 0,73$ dans butanol-acide acétique-eau-pyridine (30:6:24:20).

$R_f = 0,66$ dans butanol-éthanol-eau (5:1:4).

A - Analyse qualitative et quantitative. Le peptide P est hydrolysé par HCl 6 N ; l'hydrolysât est analysé par chromatographie sur papier dans le solvant VIII en présence d'une gamme d'acides aminés témoins à différentes concentrations selon Polson et coll. (121). On identifie tous les acides aminés de la peptidolipine NA.

Ce résultat est précisé par dosage sur Amberlite CG 120 (figure 9).

P est un hexapeptide de formule brute : Ala₂, *allo*-Ileu₁, Pro₁, Thr₁, Val₁, dont nous avons recherché l'enchaînement peptidique.

B - Aminoacide N-terminal. Il est déterminé par la méthode de Sanger au DNFB. Le DNP peptide formé est hydrolysé ; le DNP aminoacide isolé par extraction à l'éther est séparé du dinitrophénol par sublimation sous vide de celui-ci (122). Il est identifié à la DNP thréonine par chromatographie sur papier, en présence de DNP aminoacides authentiques, dans deux systèmes de solvants : phénol-alcool isoamylique-eau (1:1:1) (123) et toluène-pyridine-chloroéthanol-ammoniaque 0,8 N (30:9:18:18) (98).

Les R_f sont donnés dans le tableau 15.

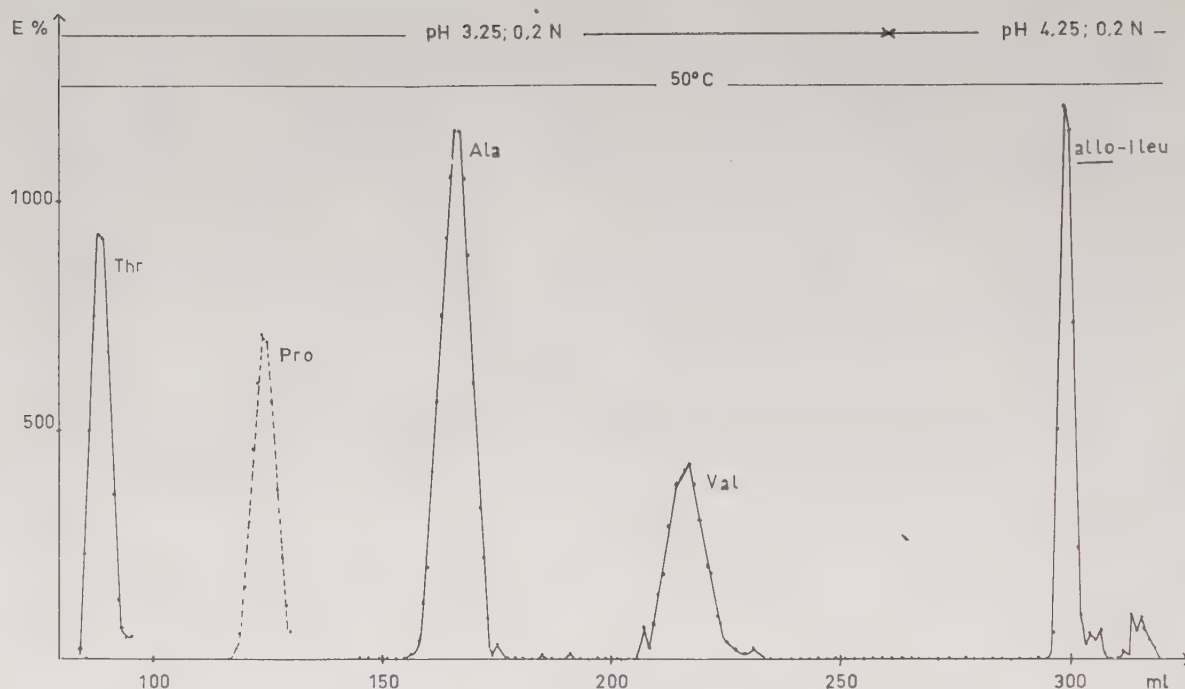


Figure 9 - Analyse quantitative des acides aminés du peptide P, sur Amberlite CG 120.

Tableau 15

R_F des DNP aminoacides dans les systèmes de solvants IX et X

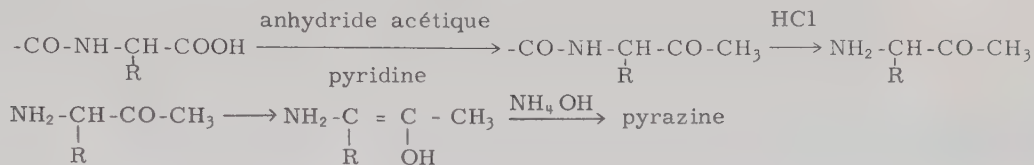
DNP acide aminé	Système IX	Système X
DNP-thréonine	0,38	0,15
DNP-alanine	0,52	0,23
DNP-proline	0,59	0,22
DNP-valine	0,66	0,34
DNP-isoleucine	0,73	0,42
DNP inconnu	0,38	0,15
Système IX : phénol-alcool isoamylique-eau (1:1:1)		
Système X : toluène-pyridine-chloroéthanol-ammoniaque 0,8 N (30:9:18:18)		

L'acide aminé N-terminal est donc la thréonine. Ce résultat était prévisible. En effet, les peptides possédant comme acide aminé N-terminal le glycocolle, la sérine, la thréonine, la proline, l'hydroxyproline, l'asparagine et l'acide cystéique donnent une coloration jaune avec la ninhydrine, coloration qui peut ensuite virer au violet (124). D'autre part, le réactif periodate-benzidine révèle le peptide P : après chromatographie dans le solvant VIII on observe une tache blanche sur fond bleu de R_F 0,72. Le groupement -NH₂ de la thréonine est donc libre (90) (82).

C - Acide aminé C-terminal. La carboxypeptidase n'a pas d'action sur l'hexapeptide P. Par conséquent on peut prévoir la présence d'un D-aminoacide soit en position C-terminale, soit en position préterminale (125).

Nous avons utilisé la réaction de Dakin-West (126) dont diverses variantes ont été proposées par Turner et Schmerzler (127), Shepherd et coll. (128) et Russel (54). Ces différentes techniques ont été expérimentées sur des échantillons de glutathion. La technique de Shepherd et coll. qui donne les meilleurs résultats a été adoptée. Le mélange anhydride acétique-pyridine (3:2) agit à 80° sur

les peptides en transformant l'acide aminé C-terminal en cétone aminée. Le composé obtenu est hydrolysé. La cétone aminée présente dans l'hydrolysate est oxydée en pyrazine en milieu ammoniacal ou séparée des acides aminés par passage sur résine de Dowex 2 sur laquelle elle n'est pas retenue. Dans les deux cas, elle n'est plus détectée à la ninhydrine et par comparaison des hydrolysats avant et après réaction on identifie l'acide aminé C-terminal du peptide.



La réaction est appliquée au peptide P et l'hydrolysate est chromatographié sur Amberlite CG 120. On constate la présence de cinq acides aminés : Thr, Ala, Val, *allo*-Ileu, Pro, en proportions équimoléculaires. Une molécule d'alanine a été éliminée.

L'alanine est donc C terminale et l'hexapeptide P peut s'écrire : Thr-(Ala, *allo*-Ileu, Pro, Val)-Ala.

D - Hydrolyse partielle du peptide P. Il est soumis à une hydrolyse ménagée par HCl concentré à 37° pendant 72 heures. L'hydrolysat chromatographié sur papier dans le solvant VIII est révélé à la ninhydrine et à l'isatine.

Plusieurs composés réagissent à la ninhydrine : à côté de traces de thréonine et d'alanine, on observe deux taches ($j \rightarrow v$) un peptide P_a de R_F 0,55 et un autre de même R_F que P ($R_F = 0,72$).

Cette dernière tache réagit également en partie à l'isatine ; elle correspond à un peptide P_6 de R_F 0,70, qui n'est donc pas séparé de l'hexapeptide initial non hydrolysé. On obtient P_5 et P_6 par deux chromatographies préparatives successives. Le solvant VIII permet d'isoler P_5 et le mélange $P + R_5$. Le solvant alcool isopropylique-pyridine-acide acétique-eau (4 : 4 : 0,5 : 2) sépare R_5 ($R_F = 0,70$) de P ($R_F = 0,85$).

- Etude de P_a. Il est hydrolysé par HCl 6 N et l'hydrolysat est analysé par chromatographie sur Amberlite CG 120. On décèle trois acides aminés Ala, Thr, Val en quantités équimoléculaires ; ils appartiennent à un tripeptide.

L'acide aminé N-terminal est la thréonine ; en effet le peptide réagit en jaune à la ninhydrine et il est révélablé par le système périodate-benzidine. D'autre part, après réaction de Sanger, on identifie le DNP acide aminé formé à la DNP thréonine par chromatographie sur papier dans le solvant phénol-alcool isoamylique-eau (1 : 1 : 1). L'acide aminé C-terminal est l'alanine. Après réaction de Dakin-West et chromatographie sur papier dans le solvant VIII de l'hydrolysât chlorhydrique on ne retrouve que deux acides aminés : thréonine et valine (figure 10).

Par suite la structure de P_a est Thr-Val-Ala.

La carboxypeptidase ne réagit pas sur ce tripeptide ; l'alanine a sans doute la configuration D car nous avons vu précédemment que la valine était entièrement sous la forme L. Pour le vérifier, nous avons fait agir sur un hydrolysât du peptide P₂ la D-aminoacide oxydase en milieu tampon pyrophosphate 0,1 M pH 8,2 en présence de FAD (129). Le produit de la réaction est dessalifié sur Dowex 2 puis chromatographié sur papier dans le solvant VIII (figure 11). L'alanine n'apparaît plus ; elle possède réellement la configuration D et la structure de P₂ est : L-Thr - L-Val - D-Ala.

- Etude de P_b. Il est hydrolysé par HCl 6 N et l'hydrolysat est analysé par chromatographie sur Amberlite CG 120. On décèle trois acides aminés en proportions équimoléculaires : ils appartiennent à un tripeptide : Ala, *allo*-Ileu, Pro.

La proline est N-terminale. En effet, nous avons vu précédemment que P₁ donne après chromatographie sur papier une coloration bleue avec l'isatine, réaction caractéristique de la proline et des peptides à proline N-terminale (91).

L'alanine est C-terminale : après réaction de Dakin-West, on ne retrouve que deux acides aminés, proline et *allo*-isoleucine comme le montre la figure 12.

La configuration des acides aminés peut être déduite des résultats déjà acquis. Nous avons vu que, dans le peptidolipine NA, la proline est sous la forme L et l'*allo*-isoleucine sous la forme D.

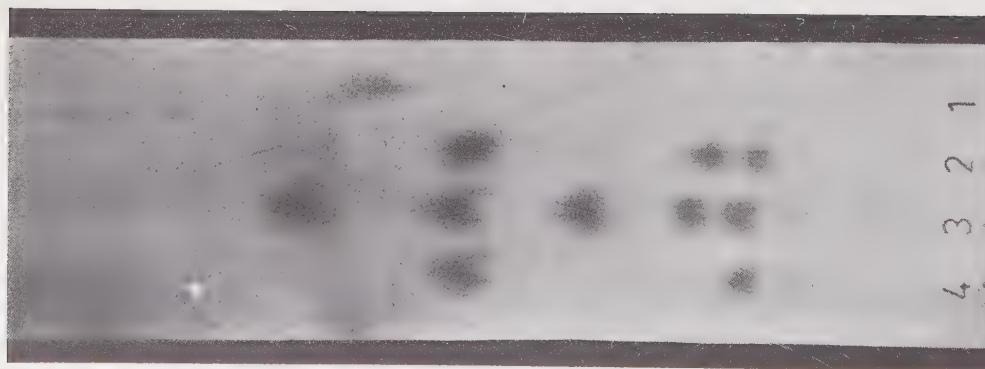


Figure 10 - Réaction de Dakin-West sur le tripeptide P_a .
 1/ Peptide P_a . 2/ Peptide P_a hydrolysé. 3/ Acides aminés témoins,
 par ordre de R_f croissant : Thr, Ala, acide α -aminobutyrique, Val,
 Ileu. 4/ Peptide P_a hydrolysé après réaction de Dakin-West.

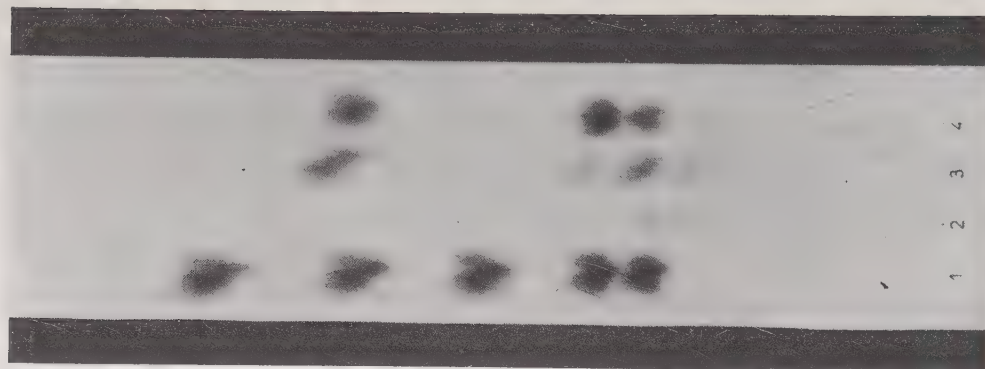
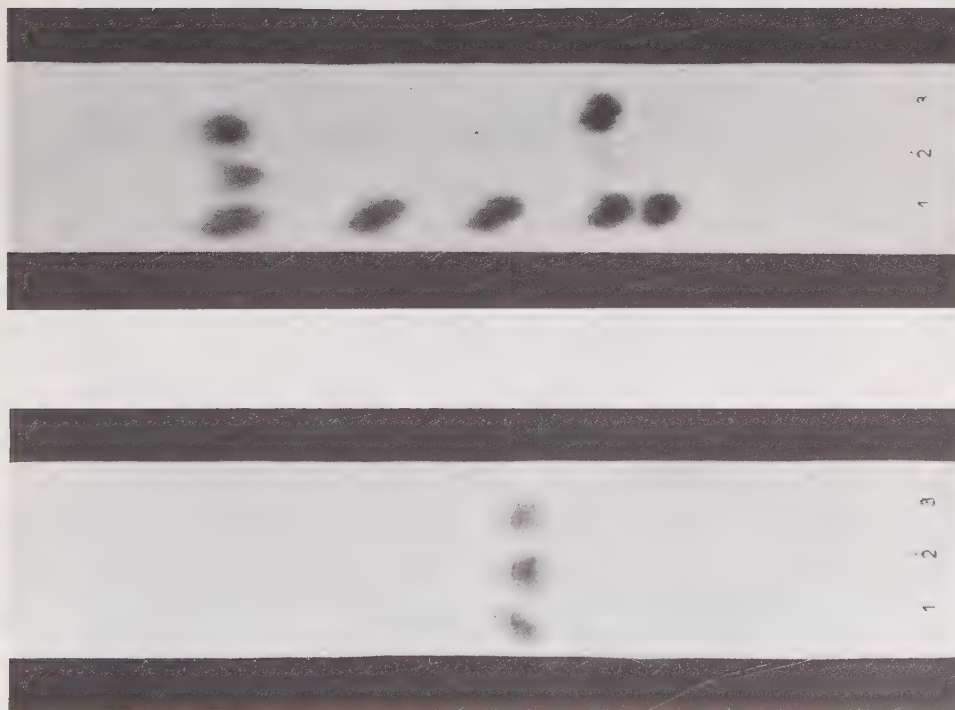


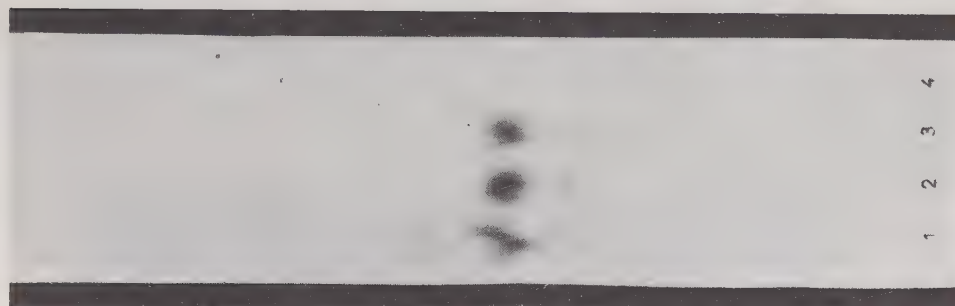
Figure 11 - Action de la D-aminoacide oxydase sur le tripeptide P_a .
 1/ Acides aminés témoins, par ordre de R_f croissant : Thr, Ala,
 acide α -aminobutyrique, Val, Ileu. 2/ D-aminoacide oxydase témoin,
 3/ Peptide P_a hydrolysé après action de la D-aminoacide oxydase.
 4/ Peptide P_a hydrolysé.



Révélation à l'isatine

Révélation à la ninhydrine

Figure 12 - Réaction de Dakin-West sur le tripeptide P₁.
1/ Acides aminés témoins, par ordre de R_f croissant : Thr, Ala, Pro, acide α-aminobutyrique, Val, Ileu, 2/ Peptide P₁ hydrolysé après réaction de Dakin-West. 3/ Peptide P₁ hydrolysé.



Révélation à l'isatine

Révélation à la ninhydrine

Figure 13 - Action de la D-aminoacide oxydase sur le tripeptide P₁.
1/ Acides aminés témoins, par ordre de R_f croissant : Thr, Ala, Pro, acide α-aminobutyrique, Val, Ileu, 2/ Peptide P₁ hydrolysé. 3/ Peptide P₁ hydrolysé après action de la D-aminoacide oxydase. 4/ D-aminoacide oxydase témoin.

Quant à l'alanine une molécule appartient à la série L et une molécule à la série D. Puisque le peptide P_a possède une molécule de D-alanine, le peptide P_b renferme la L-alanine. Nous l'avons vérifié par action de la D-aminoacide oxydase sur un hydrolysats de P_b dans les conditions décrites précédemment. L'*allo*-isoleucine est détruite mais on retrouve la proline et l'alanine (figure 13). D'autre part la carboxypeptidase ne réagit pas sur P_b , ceci s'explique par la présence de la D-*allo*-isoleucine au voisinage de l'acide aminé C-terminal.

Le peptide P_b possède donc la structure suivante : L-Pro - D-*allo*-Ileu - L-Ala et l'hexapeptide initial s'écrit :

L-Thr - L-Val - D-Ala - L-Pro - D-*allo*-Ileu - L-Ala.

Cette structure a été vérifiée par la méthode d'Edman (130) appliquée à l'échelle microanalytique (131).

E - Réaction d'Edman sur l'hexapeptide P. En milieu alcalin, le phénylthiocyanate transforme les peptides en phénylthiocarbamylpeptides (PTC peptides). L'acide chlorhydrique 3 N cyclise puis détache l'acide aminé N-terminal sous forme de phénylthiohydantoïne (PTH aminoacide). La formation de ce dérivé est contrôlée par l'étude de l'absorption ultraviolette de la solution chlorhydrique en fonction du temps. Dans le cas de l'hexapeptide P on observe un maximum à 264 m μ dont l'intensité est optimale au bout de trois heures, temps qui correspond à la libération totale du PTH aminoacide N-terminal (figure 14). Celui-ci est alors extrait à l'acétate d'éthyle et le pentapeptide résiduel est purifié par chromatographie préparative dans le solvant VIII ($R_f = 0,80$). L'hydrolysats total d'une partie aliquote de ce peptide indique l'absence de thréonine.

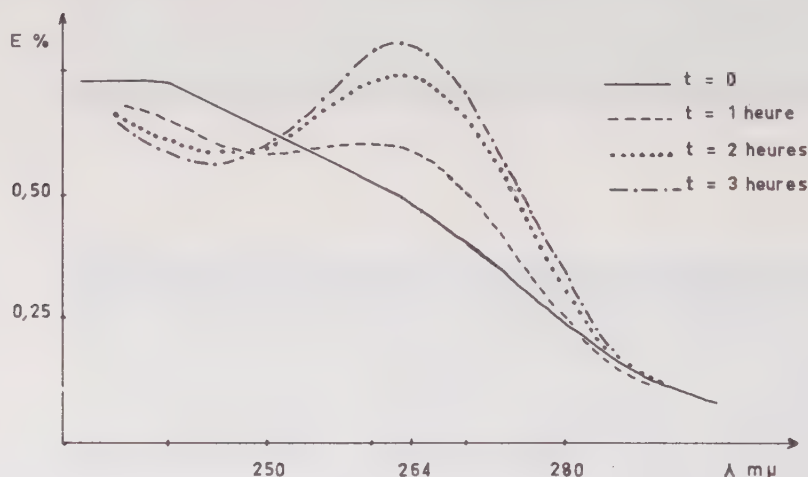


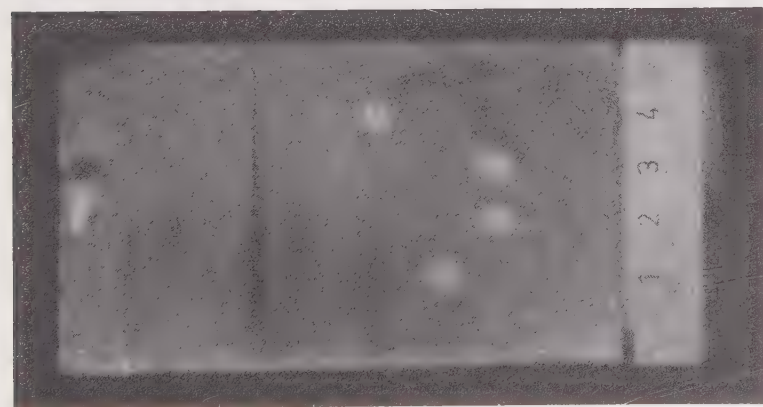
Figure 14 - Courbes d'absorption de la PTH thréonine.

La réaction d'Edman est répétée sur le pentapeptide. On isole un nouveau PTH aminoacide et un tétrapeptide de $R_f 0,74$ dans le solvant VIII. L'hydrolyse de celui-ci indique l'absence de valine.

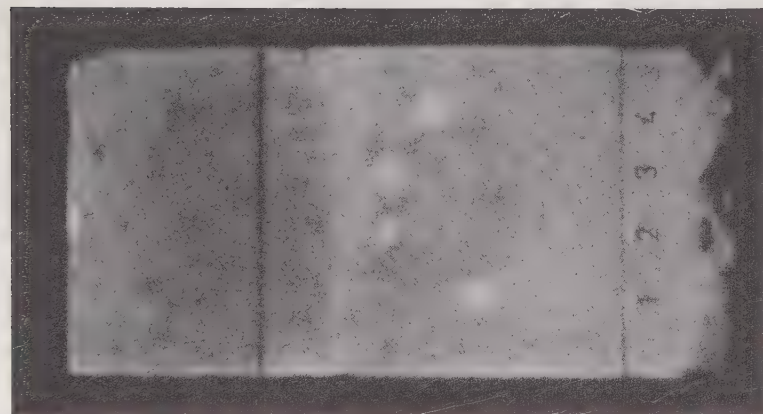
Une troisième réaction d'Edman sur ce tétrapeptide conduit à un tripeptide de $R_f 0,70$ dans le solvant VIII. Il réagit à l'isatine et l'hydrolyse totale fournit les trois aminoacides, alanine, *allo*-isoleucine, proline : il s'agit de P_b .

Nous avons vérifié la nature des PTH aminoacides par chromatographie en couches minces dans le solvant heptane-pyridine-acétate d'éthyle (5:3:2) (132). Nous avons opéré en présence de PTH aminoacides témoins que nous avons synthétisés (131). La figure 15 indique les résultats ; on identifie successivement : PTH thréonine, PTH valine et PTH alanine. L'élimination successive de ces PTH dérivés et la présence de proline à côté de l'alanine confirment la séquence peptidique établie précédemment : L-Thr - L-Val - D-Ala - L-Pro - D-*allo*-Ileu - L-Ala.

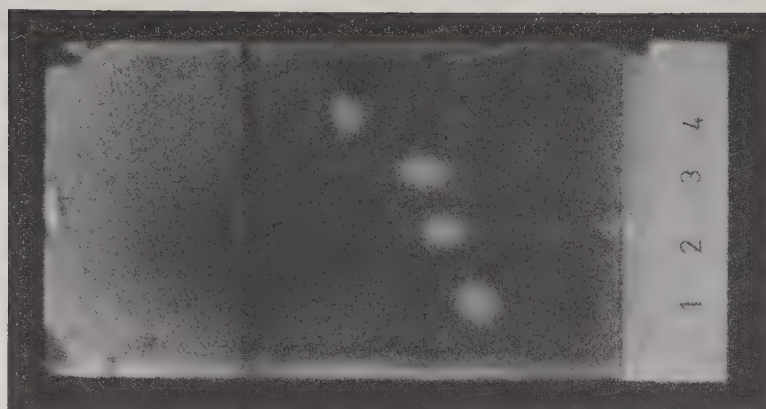
La partie peptidique de la peptidolipine NA étant constituée de sept acides aminés, il reste à préciser l'emplacement d'une molécule de thréonine. Dans ce but, nous avons entrepris l'étude du peptide Q.



1. PTH alanine
2. PTH inconnu
3. PTH thréonine
4. PTH valine



1. PTH thréonine
2. PTH inconnu
3. PTH valine
4. PTH alanine



1. PTH thréonine
2. PTH inconnu
3. PTH alanine
4. PTH valine

Figure 15 - Chromatographies en couches minces des PTH aminoacides.

3/ Etude du peptide Q.

C'est une poudre jaune, F. 149-150°. Le poids moléculaire déterminé par titrage acidimétrique est de 980-990.

L'hydrolyse totale conduit à une fraction éthérosoluble lipidique et à une fraction hydrosoluble. L'analyse de cette dernière par chromatographie sur papier dans le solvant VIII, en présence d'une gamme d'acides aminés témoins, indique la présence de sept moles d'acides aminés : Ala₂, *allo*-Ileu₁, Pro₁, Thr₂, Val₁.

Par suite, Q est un peptidolipide qui renferme tous les constituants de la peptidolipine NA. Il possède un groupement -NH₂ libre puisqu'il réagit à la ninhydrine et une fonction COOH libre puisqu'il a une acidité titrable par la potasse méthanolique.

Sa structure est complexe et sera déterminée au chapitre V, page 61. L'étude préliminaire de ce peptidolipide ne permet pas de connaître l'enchaînement complet des aminoacides de la peptidolipine NA dont la séquence peptidique peut correspondre à deux formules A et B :

A : L-Thr - L-Val - D-Ala - L-Pro - D-*allo*-Ileu - L-Ala - L-Thr

B : L-Thr - L-Thr - L-Val - D-Ala - L-Pro - D-*allo*-Ileu - L-Ala

La première séquence est confirmée au chapitre V, page 59.

CHAPITRE IV

ÉTUDE DE LA FRACTION LIPIDIQUE

Une hydrolyse prolongée de la peptidolipine NA par HCl 6 N libère deux acides gras. Celui qui constitue la fraction principale est l'acide 2-*trans*-eicosénoïque, l'autre est l'acide 3-hydroxy-eicosanoïque.

Nous démontrons que l'acide éthylénique est formé à partir de l'acide hydroxylé, par β élimination d'une molécule d'eau, au cours de l'hydrolyse.

I - ISOLEMENT, ETUDE ET SYNTHÈSE DU 2-*TRANS*-EICOSENOATE DE METHYLE

1/ Isolement.

La peptidolipine NA soumise à une hydrolyse acide énergique par HCl 6 N à 110° pendant 72 heures est scindée en deux fractions, l'une hydrosoluble, l'autre lipidique éthersoluble représentant 33 % du composé initial.

La partie étherée est traitée par une solution aqueuse diluée de soude. A l'interface des deux phases se forme un solide incolore, soluble dans l'eau à chaud ; c'est le sel de sodium de la fraction lipidique. La phase étherée ne renferme aucun constituant neutre.

Les acides gras régénérés par acidification sont extraits à l'éther puis méthylés par le diazométhane gazeux préparé extemporanément à partir de nitrosométhylurée (133).

Les esters sont analysés par chromatographie gaz-liquide sur colonne de silicone SE 30 à 222° (figure 16). On décèle deux composés importants M_I et M_{II}, dont les pourcentages sont calculés

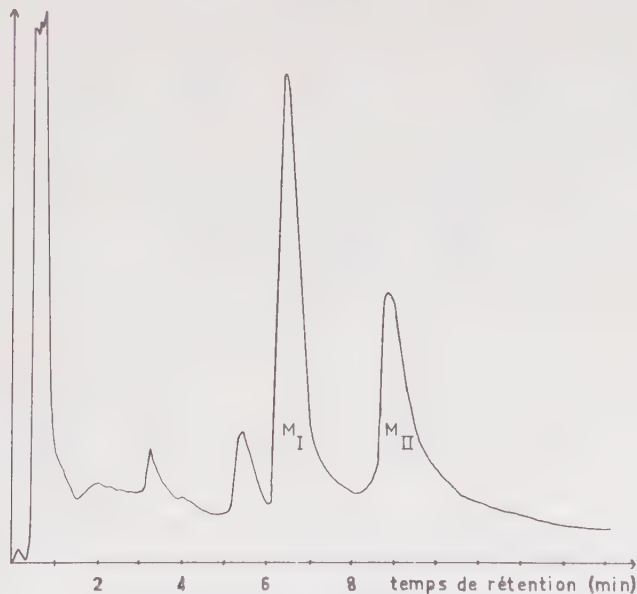


Figure 16 - Chromatographie en phase gazeuse des esters obtenus après hydrolyse de la peptidolipine NA. Colonne de Silicone SE 30 à 222°.

d'après l'aire des pics correspondants selon la méthode décrite par Dijkstra (134). M_I représentant la fraction principale (60 %) est isolé par chromatographie préparative sur colonne de DEGS à 212°.

2/ Etude.

A - Caractéristiques. C'est un solide incolore, F. 36-37°.

Le spectre de résonance magnétique nucléaire indique une insaturation trans en conjugaison avec un carbonyle ou un carboxyle. Il n'indique pas de ramification. M_I est donc un ester à chaîne droite, insaturé.

Le spectre de masse donne un poids moléculaire de 324, correspondant à $C_{21}H_{40}O_2$ où à $C_{20}H_{36}O_3$.

Le spectre ultraviolet mesuré dans l'éthanol montre un maximum à 214 m μ ($\epsilon = 11.400$) ce qui confirme la conjugaison d'une double liaison avec le carboxyle.

Le spectre infrarouge présente les bandes d'absorption - CO à 1740 cm^{-1} , et celles d'une double liaison trans à 1650 cm^{-1} et à 980 cm^{-1} . Il ne possède pas de bande OH (figure 18, courbe a).

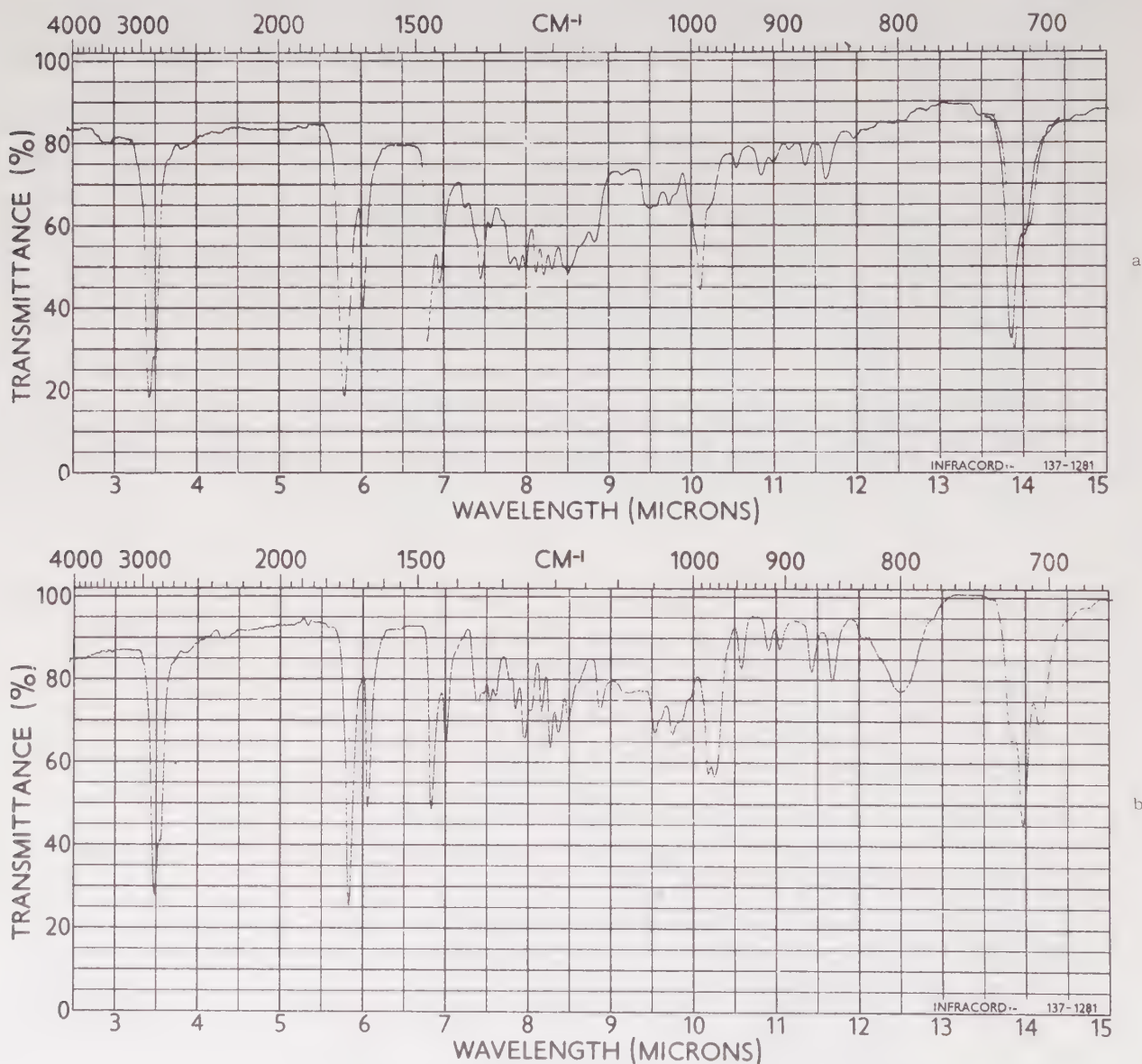
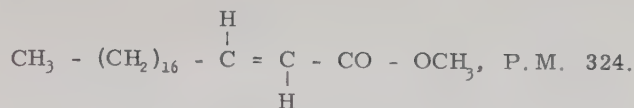


Figure 18 - Spectres infrarouges Courbe a : ester M_I
 Courbe b : 2-*trans*-eicosénoate de méthyle synthétique.

D'après l'ensemble de ces résultats, M_I peut être le 2-*trans*-eicosénoate de méthyle :



Nous avons vérifié cette structure par réduction et par oxydation.

B - Réduction. En raison de la présence possible d'une fonction cétone dans M_I , puisque le poids moléculaire de 324 convient également à un ester cétonique insaturé $\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}_3$, nous avons effectué une réduction de Wolff-Kishner modifiée selon Huang Minlon (135), réaction qui réduit les cétones de haut poids moléculaire et les composés éthyléniques (136).

M_I traité par l'hydrazine en milieu alcalin conduit à un ester qui possède à la chromatographie en phase vapeur, à 201° sur colonne DEGS, le même volume de rétention que l'eicosanoate de méthyle authentique. Le spectre de masse indique un poids moléculaire de 326 correspondant à celui de l'eicosanoate de méthyle $\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{O}_2$.

La réduction conduit donc à un ester saturé qui possède seulement une molécule d'hydrogène de plus que M_I , ce qui élimine pour celui-ci la formule d'un ester cétonique $\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}_3$. M_I est un eicosénoate de méthyle non ramifié, possédant une double liaison en α du carboxyle dont l'emplacement a été confirmé par oxydation.

C - Oxydation. La technique employée est celle de Von Rudloff (137) adaptée à l'échelle micro-analytique (138). Le produit d'oxydation de M_I par le mélange périodate-permanganate est estérifié par le diazométhane gazeux : l'ester méthylique se comporte à la chromatographie gaz-liquide sur colonne de DEGS à 205° comme le stéarate de méthyle authentique.

M_I est donc effectivement le 2-*trans*-eicosénoate de méthyle. Nous avons confirmé sa structure par synthèse, mais auparavant, nous avons étudié son comportement à la chromatographie en phase vapeur.

D - Chromatographie gaz-liquide. On chromatographie M_I ainsi qu'un mélange d'esters méthyliques témoins sur cinq colonnes différentes : une colonne polaire de DEGS et quatre colonnes non polaires, Apiezon M, Apiezon L, Silicone Rubber et Silicone SE 30.

Dans tous les cas, on constate que M_I est élué après l'eicosanoate de méthyle (figure 17).

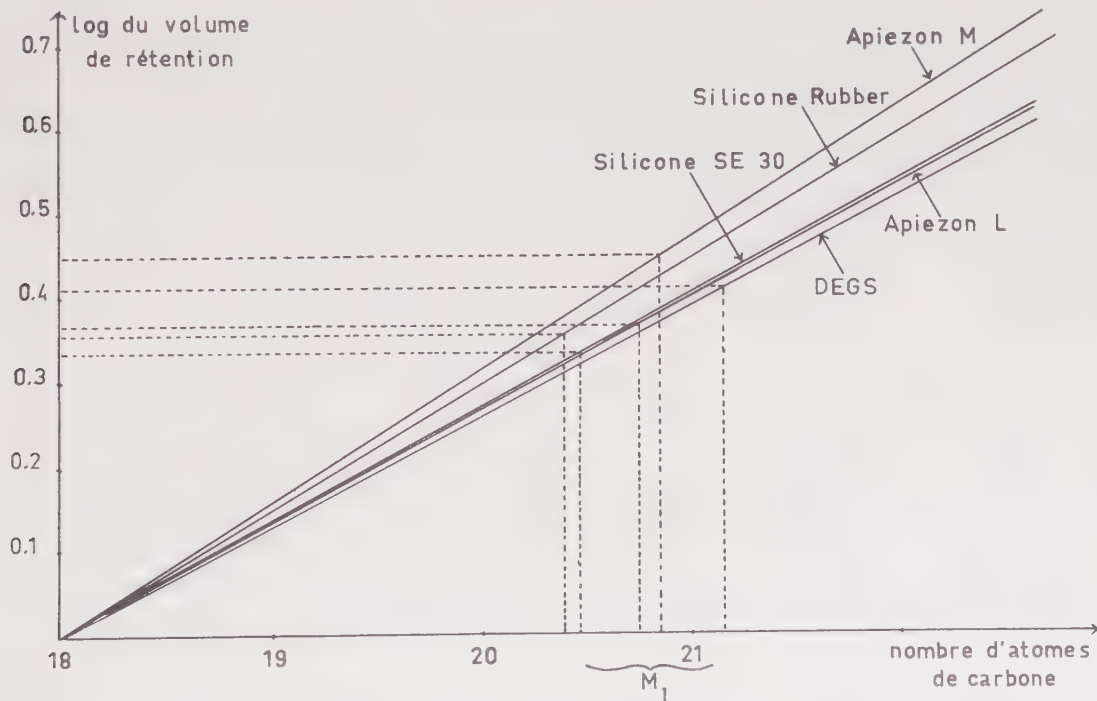


Figure 17 - Position de l'ester M_I par rapport aux esters méthyliques témoins.

Généralement, l'introduction d'une double liaison dans la molécule d'un ester d'acide gras augmente sa polarité et par suite fait décroître son affinité pour les colonnes non polaires, si bien que sur celles-ci les composés insaturés sont élués plus rapidement que les composés saturés correspondants (139). Le comportement de M_I semble donc anormal. Cependant, les acides insaturés les plus fréquemment étudiés à la chromatographie gaz-liquide possèdent une double liaison située vers le milieu de la chaîne carbonée. Il est probable que l'insaturation de M_I en α - β du groupement carboxyméthyle est responsable de l'augmentation du temps de rétention.

3/ Synthèse du 2-*trans*-eicosénoate de méthyle.

La synthèse de l'acide 2-*trans*-eicosénoïque est effectuée par condensation de l'acide malonique sur l'aldéhyde stéarique (140). Ce dernier est obtenu, soit par hydrogénation catalytique du chlorure de stéaryle, soit par oxydation de l'octadécanol.

Le chlorure de stéaryle est préparé extemporanément par addition lente de chlorure de thionyle (141) sur l'acide stéarique (142). Il est réduit par l'hydrogène gazeux en présence de Pd sur sulfate de Ba (143), (144), (145), (146).

L'octadécanol est oxydé par le dicyclohexylcarbodiimide en présence d'acide orthophosphorique (147).

Le 2-*trans*-eicosénoate de méthyle est un solide incolore, F. $36\text{--}37^\circ$. Le point de fusion du mélange avec l'ester M_I , isolé de la peptidolipine NA, ne subit pas de dépression. La composition centésimale est en accord avec la formule $C_{21}H_{40}O_2$. Le spectre ultraviolet mesuré dans l'éthanol montre un maximum à $213\text{ m}\mu$ ($\epsilon = 10.050$).

Le spectre infrarouge présente la bande d'absorption d'une liaison éthylénique à 1650 cm^{-1} . Il indique pour cette insaturation la forme *trans* (bande à 980 cm^{-1}), (figure 18, courbe b). Le spectre de masse donne un poids moléculaire de 324.

La chromatographie gaz-liquide permet de l'identifier à M_I (figure 19). L'hydrogène en présence d'oxyde de platine le transforme en un ester de même volume de rétention que l'eicosanoate de méthyle authentique, sur colonne d'Apiezon L à 258° , (figure 20, courbe c). Après action du mélange périodate-permanganate, le produit d'oxydation estérifié se comporte à la chromatographie gaz-liquide comme l'octadécanoate de méthyle authentique, (figure 20, courbe d).

Ainsi les propriétés de l'ester de synthèse sont semblables à celles de l'ester M_I isolé de la peptidolipine NA, ce qui confirme la nature de celui-ci.

L'acide 2-*trans*-eicosénoïque paraît constituer la fraction lipidique de la peptidolipine NA. Mais plusieurs constatations sont en désaccord avec cette hypothèse : cet acide ne représente que 60 % de la partie lipidique (voir p. 46). D'autre part, on ne décèle pas d'insaturation sur le spectre de résonance magnétique nucléaire de la peptidolipine NA et une oxydation de celle-ci par le périodate-permanganate ainsi qu'une ozonisation restent sans effet. La présence de cet acide insaturé est également incompatible avec la formule de la peptidolipine NA : l'acide 2-*trans*-eicosénoïque $C_{20}H_{38}O_2$ et l'heptapeptide $C_{30}H_{53}N_7O_{10}$ conduisent à un peptidolipide cyclique ayant pour formule $C_{50}H_{87}N_7O_{10}$, alors que l'analyse élémentaire de la peptidolipine est en bon accord avec la formule $C_{50}H_{89}N_7O_{11}$, qui possède une molécule d'eau de plus.

Calculé pour :

$C_{50}H_{87}N_7O_{10}$ % C 63,46 H 9,27 N 10,36

$C_{50}H_{89}N_7O_{11}$ % C 62,27 H 9,30 N 10,17

Trouvé pour la peptidolipine NA % C 62,28 H 9,55 N 10,21; la structure cyclique de la peptidolipine NA est démontrée au chapitre V p. 57).

L'acide 2-*trans*-eicosénoïque pourrait donc être un artefact formé au cours de l'hydrolyse, par exemple par déshydratation de l'acide β -hydroxyeicosanoïque. Une telle déshydratation a déjà été observée lors de l'hydrolyse d'antibiotiques lipopeptidiques comme l'espérine (57) et la viscosine (22).

Parmi les produits d'hydrolyse de la peptidolipine NA, nous avons effectivement identifié la fraction M_{II} (voir p. 45) avec l'ester méthylrique de l'acide 3-hydroxyeicosanoïque.

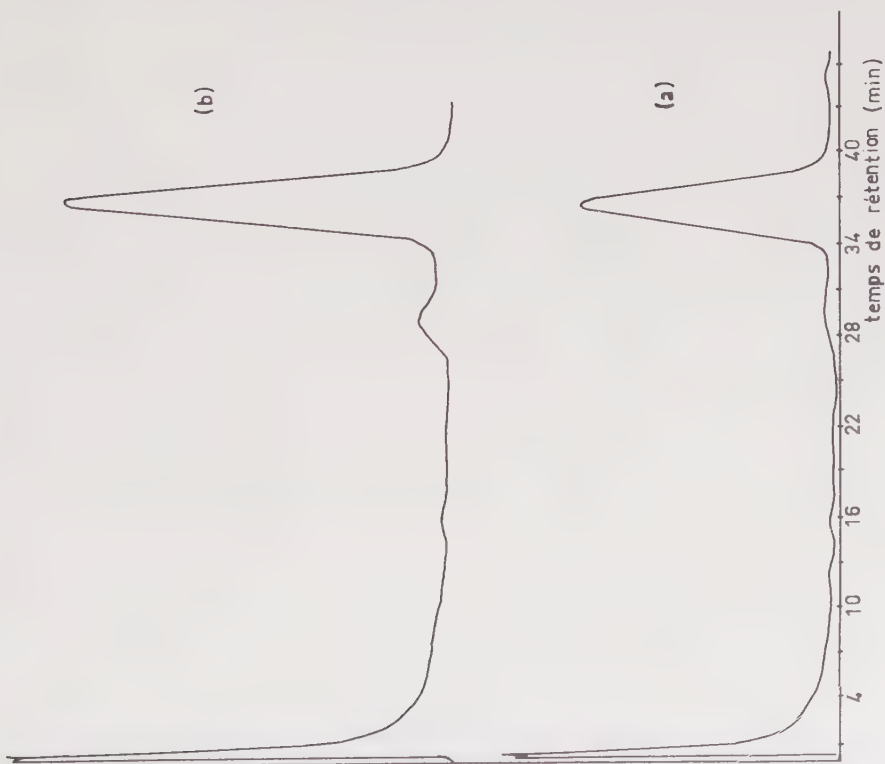


Figure 19 - Chromatographie en phase gazeuse. Colonne d'Apiezon L à 258°.
 Courbe a : ester M_r . Courbe b : 2-*trans*-eicosanoate de méthyle synthétique.

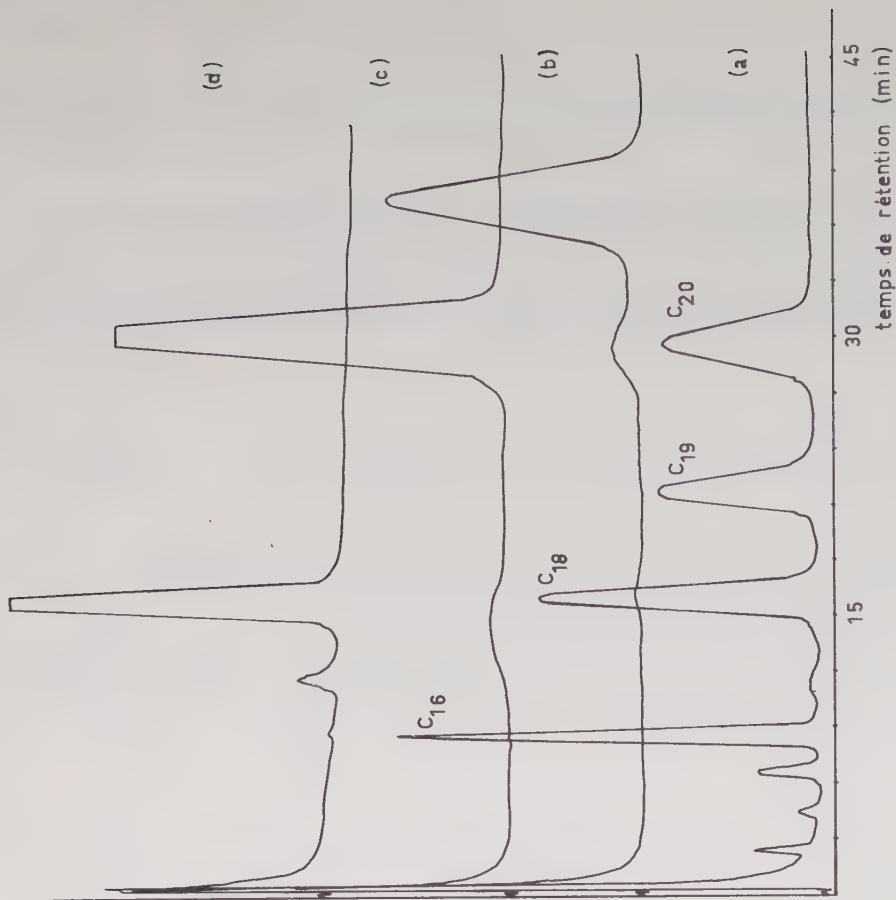


Figure 20 - Chromatographie en phase gazeuse. Colonne d'Apiezon L à 258°.
 Courbe a : esters méthyliques témoins. Courbe b : 2-*trans*-eicosanoate de méthyle synthétique. Courbe c : ester méthylique obtenu après réduction du 2-*trans*-eicosanoate de méthyle synthétique. Courbe d : ester méthylique obtenu après oxydation du 2-*trans*-eicosanoate de méthyle synthétique.

II - SYNTHÈSE, ISOLEMENT ET ÉTUDE DU 3-HYDROXYEICOSANOATE DE MÉTHYLE

1/ Synthèse du 3-hydroxyeicosanoate de méthyle.

Elle est effectuée par la réaction de Reformatsky (148). Une solution de stéaraldéhyde dans le benzène anhydre est agitée vigoureusement avec un mélange de bromacétate d'éthyle et de zinc fraîchement purifié.

Le 3-hydroxyeicosanoate d'éthyle est saponifié par la potasse méthanolique et l'acide obtenu est reprecipité dans l'acétate d'éthyle.

Il est méthylé par le diazométhane et l'ester est purifié par chromatographie préparative en couches minces sur gel de silice dans le solvant hexane-éther (60:40) (149). On élue la tache de R_f 0,45, et le produit obtenu est reprecipité dans l'hexane.

C'est un solide incolore, F. 58°. L'analyse élémentaire est en accord avec la formule $C_{21}H_{42}O_3$.

Le spectre infrarouge possède la bande caractéristique de la fonction hydroxyle à 3.300 cm^{-1} (figure 24, courbe a). La présence de l'hydroxyle a été confirmée par acétylation et sa position précisée par oxydation chromique. Cette étude est exposée, pages 52-55 parallèlement à celle de M_{II} .

Le 3-hydroxyeicosanoate de méthyle chromatographié sur colonne de silicone SE 30 à 200°, ainsi qu'un mélange d'esters témoins, est élué légèrement avant le docosanoate de méthyle. La présence d'un hydroxyle dans la molécule d'un acide gras augmente effectivement le volume de rétention de celui-ci sur colonne non polaire (150), (151), (152).

Si l'on étudie simultanément les esters obtenus après hydrolyse chlorhydrique prolongée de la peptidolipine NA, on constate que M_{II} s'identifie au 3-hydroxyeicosanoate de méthyle (figure 21) conformément à l'hypothèse précédente (voir p. 48). Pour préciser ce résultat nous avons isolé M_{II} .

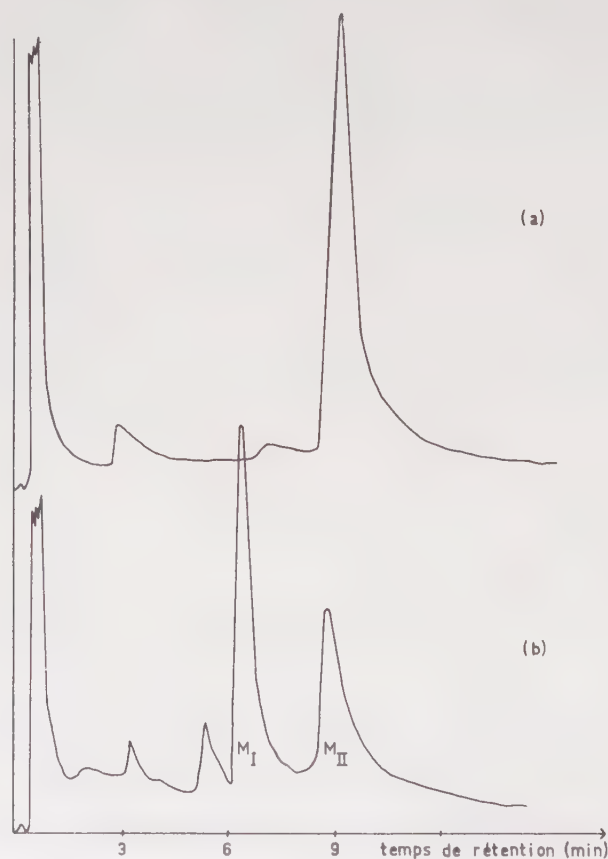


Figure 21 - Chromatographie en phase gazeuse. Colonne de Silicone SE 30 à 222°. Courbe a : 3-hydroxyeicosanoate de méthyle. Courbe b : esters méthyliques obtenus après hydrolyse de la peptidolipine NA.

2/ Isolement du 3-hydroxyeicosanoate de méthyle.

Nous avons en premier lieu recherché les conditions d'hydrolyse correspondant à une déshydratation minimum. Nous avons utilisé pour cette étude un amide synthétique. Nous verrons en effet au chapitre suivant que la partie lipidique de la peptidolipine NA est liée à une molécule d'acide aminé par une fonction amide.

A - Synthèse du N-(3-hydroxy-eicosanoyl)-alaninate d'éthyle. On fait agir le dicyclohexylcarbodiimide, en présence de triéthylamine, sur une solution chloroformique d'acide 3-hydroxyeicosanoïque et de l'ester éthylique du chlorhydrate d'alanine (153) et (154). L'amide obtenu est purifié par chromatographie sur acide silicique. Le spectre infrarouge possède les bandes caractéristiques de la fonction amide à 1530-1640 et 3250 cm^{-1} (figure 22). L'analyse élémentaire est en accord avec la formule $\text{C}_{25}\text{H}_{49}\text{NO}_4$.

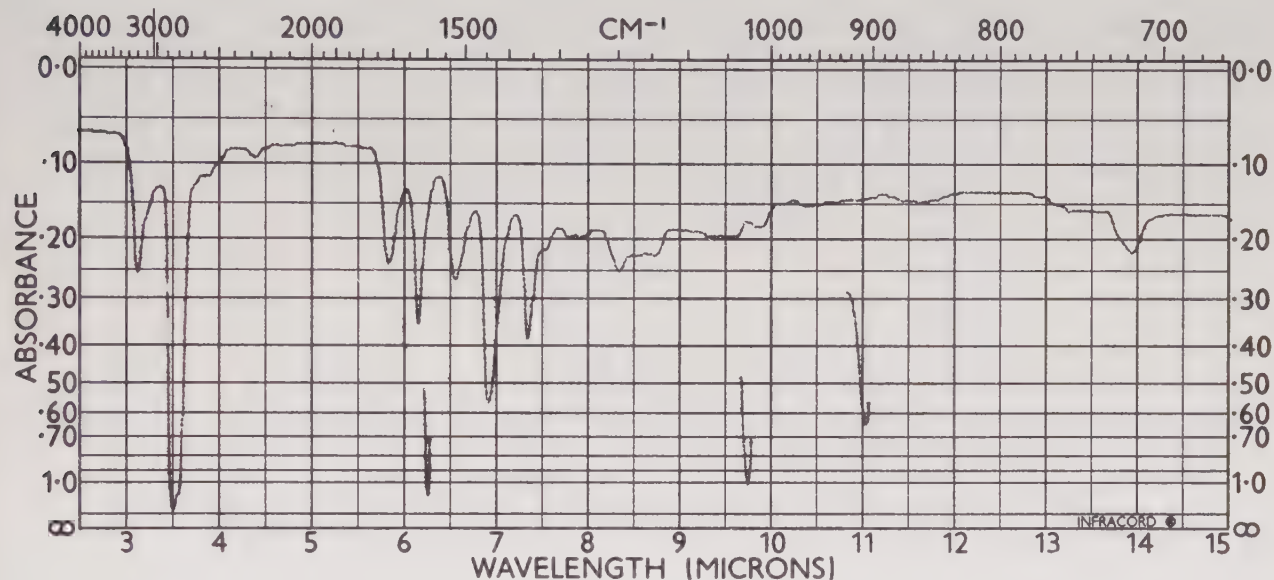


Figure 22 - Spectre infrarouge du N-(3-hydroxyeicosanoyl)-alaninate d'éthyle.

B - Hydrolyses du N-(3-hydroxy-eicosanoyl)-alaninate d'éthyle. Dans un premier essai, nous avons vérifié qu'une hydrolyse par HCl 6 N à 110° pendant 72 heures conduisait à un mélange d'acide 2-*trans*-eicosénoïque et 3-hydroxyeicosanoïque. La fraction lipidique obtenue est estérifiée puis étudiée par chromatographie en phase vapeur sur colonne de silicone SE 30 à 210° . On constate effectivement la présence du 2-eicosénoate de méthyle (62 %) et du 3-hydroxyeicosanoate de méthyle (38 %) ; ces pourcentages rappellent ceux que l'on obtient à partir de la peptidolipine NA (60 % et 40 %). Une β élimination se produit donc au cours de l'hydrolyse par HCl 6 N.

Dans un second essai, nous avons utilisé un mode d'hydrolyse spécifique des liaisons amides selon Crombie (155). Nous avons fait agir un mélange à parties égales d' HCl concentré et de méthanol, à 120° pendant 16 heures. La fraction lipidique extraite à l'éther est méthylée puis étudiée à la chromatographie en phase vapeur sur colonne de silicone SE 30 à 222° . On observe la présence unique du 3-hydroxyeicosanoate de méthyle. Il n'y a pas de déshydratation et nous avons adopté ce mode d'hydrolyse pour isoler l'acide 3-hydroxyeicosanoïque naturel de la peptidolipine NA.

C - Hydrolyse de la peptidolipine NA selon Crombie. La peptidolipine NA est hydrolysée par HCl concentré en milieu méthanolique, à 120° pendant 16 heures. La partie lipidique extraite à l'éther représente environ 30 % du composé initial. Elle est estérifiée par le diazométhane puis étudiée par chromatographie en phase vapeur sur colonne de silicone SE 30 à 210° (figure 23). La fraction principale M_{II} (82 %) s'identifie avec le 3-hydroxyeicosanoate de méthyle.

M_{II} est isolé par chromatographie préparative en couches minces sur gel de silice dans le solvant hexane-éther (60:40) où il est nettement séparé de M_{I} ($R_f \text{ M}_{\text{II}} = 0,45$; $R_f \text{ M}_{\text{I}} = 0,84$).

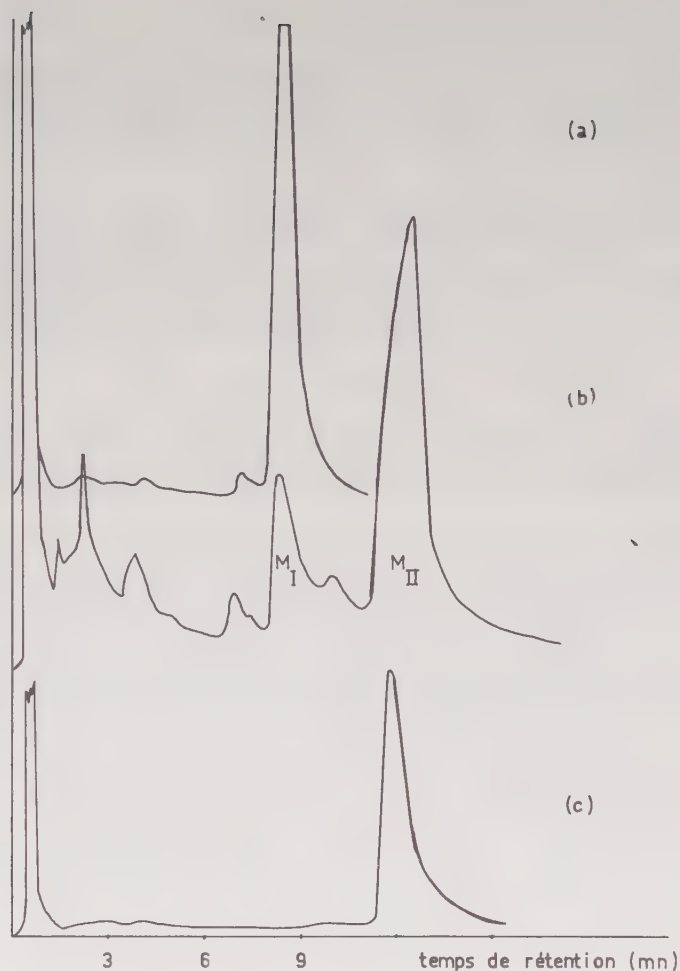


Figure 23 - Chromatographie en phase gazeuse. Colonne de Silicone SE 30 à 210°. Courbe a : 2-*trans*-eicosénoate de méthyle synthétique. Courbe b : esters méthyliques après hydrolyse de la peptidolipine NA selon Crombie. Courbe c : 3-hydroxyeicosanoate de méthyle synthétique.

3/ Etude du 3-hydroxyeicosanoate de méthyle.

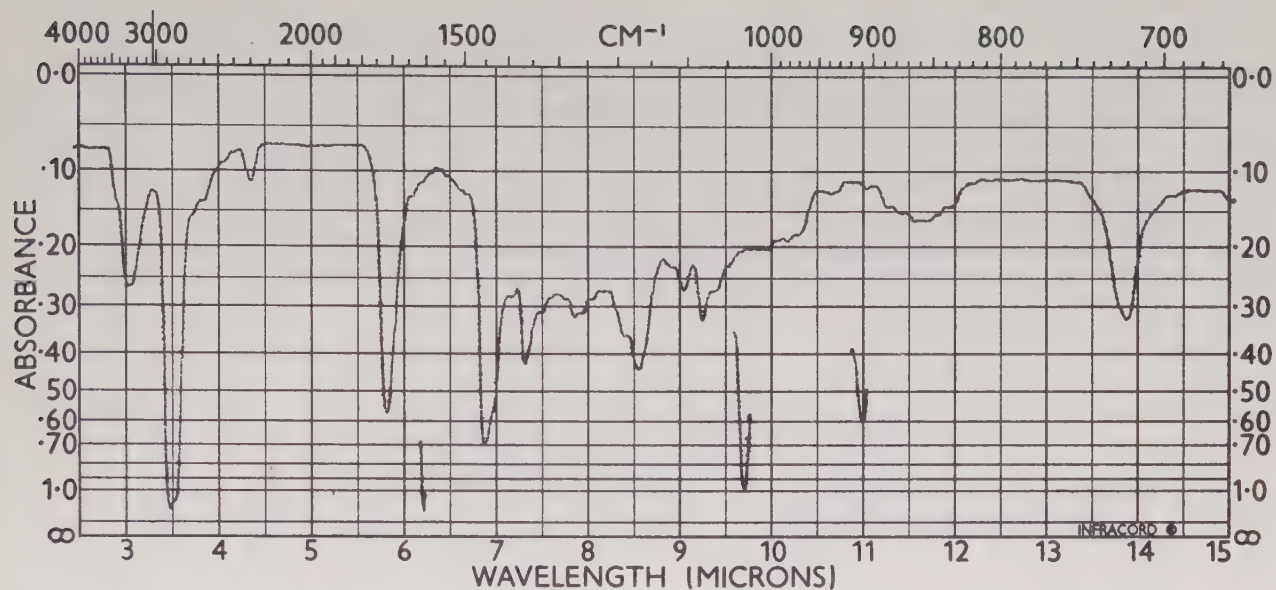
M_{II} est un solide incolore, F. 58°. F. du 3-hydroxyeicosanoate de méthyle authentique 58°. Le point de fusion du mélange ne subit pas de dépression. Ces deux esters ont des spectres infrarouges identiques (figure 24, courbes a et b), et ils ont le même volume de rétention à la chromatographie en phase vapeur sur colonne de silicone SE 30 à 200° (figure 25).

La présence de l'hydroxyle a été confirmée par acétylation.

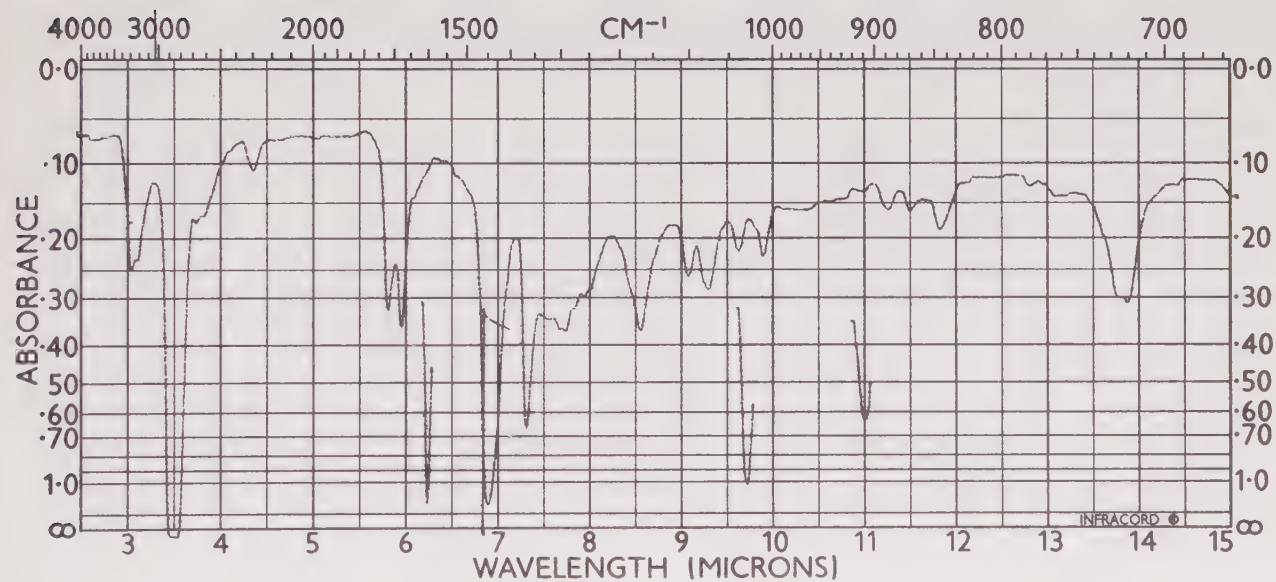
A - Acétylation. L'acétylation de M_{II} et du 3-hydroxyeicosanoate de méthyle, par l'anhydride acétique 2 M dans l'acétate d'éthyle en présence d'acide perchlorique (156), donne un produit dont le spectre infrarouge ne possède plus la bande hydroxyle à 3.300 cm⁻¹ mais les bandes acétate à 1240 et 1020 cm⁻¹. Les volumes de rétention de ces acétates à la chromatographie gaz-liquide sur colonne de silicone SE 30 à 210° sont identiques et supérieurs à celui du docosanoate de méthyle. En effet sur colonnes polaires et nonpolaires, les acétates sont plus fortement retenus que les composés hydroxylés dont ils dérivent (152) (157).

L'acétylation confirme donc la présence d'un hydroxyle dans les deux esters étudiés. Une oxydation chromique vérifie la position de cet hydroxyle en β du carboxyle.

B - Oxydation chromique. Une oxydation chromique ménagée du β-hydroxyester conduit à un céto-ester. Après saponification, l'acide correspondant se décarboxyle et donne la 2-nonadécane.



a



b

Figure 24 - Spectres infrarouges.

Courbe a : 3-hydroxyeicosanoate de méthyle synthétique. Courbe b : ester M_{II}

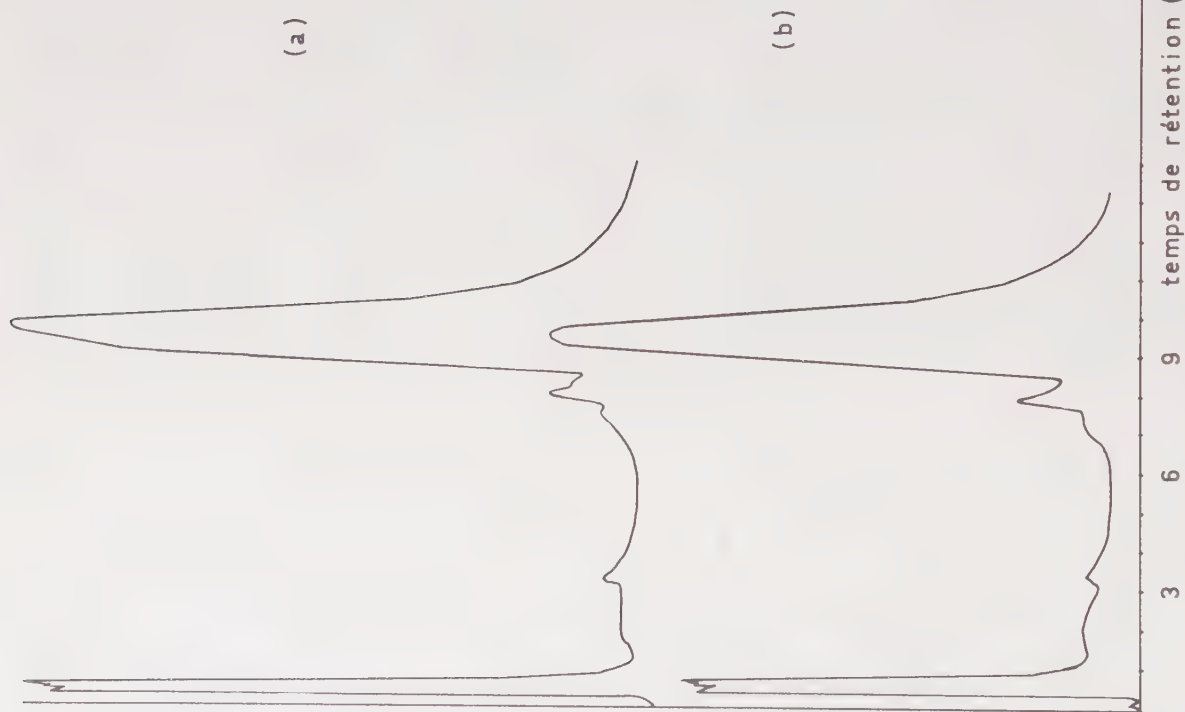


Figure 25 - Chromatographie en phase gazeuse. Colonne de Silicose SE 30 à 200°. Courbe a : 3-hydroxyeicosanoate de méthyle synthétique. Courbe b : ester M_{II}

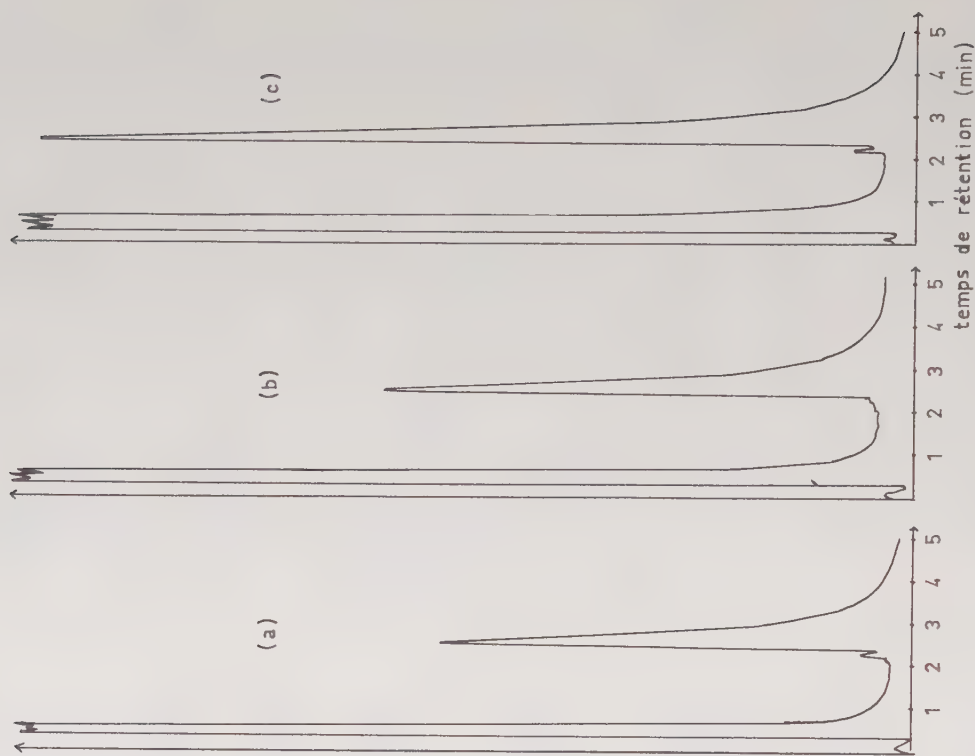


Figure 26 - Chromatographie en phase gazeuse. Colonne de Silicose SE 30 à 200°. Courbe a : fraction neutre obtenue après oxydation chromique de M_{II} . Courbe b : 2 nonadécane synthétique. Courbe c : mélange a + b.

Nous avons synthétisé cette cétone selon la méthode de Krafft (158). L'analyse est en accord avec la formule $C_{19}H_{38}O$.

Le spectre infrarouge possède la bande carbonyle à 1709 cm^{-1} .

L'oxydation chromique du 3-hydroxyeicosanoate de méthyle et de M_{II} est effectuée parallèlement en milieu benzénique par l'anhydride chromique en présence d'acide acétique. L'excès de réactif est détruit par le méthanol. Les substances formées sont extraites au benzène puis saponifiées par la potasse méthanolique. Après acidification on recueille dans les deux cas un mélange de fractions neutre et acide.

- La fraction neutre est séparée par chromatographie sur alumine. L'hexane élue un produit incolore identifié à la 2-nonadécانونe, F. 54° ; il n'y a pas de dépression du point de fusion en mélange avec la cétone synthétique. Les spectres infrarouges sont identiques, ainsi que les volumes de rétention à la chromatographie en phase vapeur sur colonne de silicone SE 30 à 200° (figure 26).

- La fraction acide extraite à la soude puis régénérée par acidification est estérifiée; par chromatographie gaz-liquide sur colonne de silicone SE 30 à 222° on identifie le stéarate de méthyle. L'acide stéarique se forme au cours de l'oxydation chromique à partir du céto-ester.

M_{II} est donc le 3-hydroxyeicosanoate de méthyle.

C - Configuration optique. Le pouvoir rotatoire de M_{II} a été mesuré. $[\alpha]_D = -8^{\circ}$ ($CHCl_3$, $c = 3,52$). L'acide correspondant est également lévogyre car il n'existe qu'une très faible différence de $[\alpha]_D$ entre acide libre et ester méthylique (159).

Ainsi la partie lipidique de la peptidolipine NA est l'acide D(-) 3-hydroxyeicosanoïque, les β -hydroxyacides de la série D étant lévogyres (150) (160).

La présence de cet acide n'a jamais été signalée dans les produits naturels. Par contre, tous les 3-hydroxyacides à chaîne droite et à nombre pair d'atomes de carbone inférieur à 20 ont déjà été trouvés.

Citons, par exemple, les acides 3-hydroxyhexanoïque et 3-hydroxyoctanoïque qui ont été isolés du charbon du maïs *Ustilago zeae* (161).

L'acide D(-) 3-hydroxydécanoïque a été obtenu par hydrolyse de plusieurs composés : de l'acide pyolipique, rhamnocide de *Pseudomonas pyocyanea* (162), d'un rhamnolipide de *Pseudomonas aeruginosa* (163) de la viscosine (22) (formule I, p. 9) et également du serratamolide (51) (formule VIII, p 13).

L'acide 3-hydroxydodécanoïque a été identifié dans les lipides de *Serratia marcescens* (151) et après hydrolyse de l'isariine métabolite de *Isaria cretacea* (58) (formule XI, p 15).

Quant à l'acide D(-) 3-hydroxytétradécanoïque, on le trouve dans un lipopolysaccharide de *Escherichia coli* (164) et (165).

Enfin, récemment, un mélange d'acides 3-hydroxyhexadécanoïque et octadécanoïque a été extrait des glycolipides de différentes espèces de *Rhodotorula* (150).

Signalons également l'existence d'un 3-hydroxyacide à nombre impair d'atomes de carbone, l'acide 3-hydroxytridécanoïque, qui constitue la partie lipidique de l'espérine (57) (formule X, p 15).

CHAPITRE V

STRUCTURE DE LA PEPTIDOLIPINE NA

Nous mettons en évidence la structure cyclique lactonique de la peptidolipine NA. Sa formule est ensuite démontrée puis vérifiée par spectrométrie de masse.

I - STRUCTURE CYCLIQUE LACTONIQUE

La peptidolipine NA contient une molécule d'acide D(-) 3-hydroxyeicosanoïque et sept molécules d'acides aminés, la L-thréonine et l'hexapeptide L-Thr - L-Val - D-Ala - L-Pro - D-*allo*-Ileu L-Ala. Nous précisons en premier lieu la nature de la liaison acide gras - peptide.

1/ Liaison acide gras - peptide.

L'hydrolyse de la peptidolipine NA par HCl 6 N, à 110°, pendant 12 heures fournit une substance éthérosoluble contenant encore de l'azote. L'hydrolyse totale de celle-ci selon Crombie (155), hydrolyse particulière des fonctions amides, libère la thréonine que l'on identifie par chromatographie sur papier dans le solvant VIII butanol-acide acétique-eau (65:10:25) : $R_f = 0,19$, R_f de la thréonine = 0,19.

Cet acide aminé est donc lié au groupement carboxylique de l'acide D(-) 3-hydroxyeicosanoïque par une liaison amide qui résiste à une hydrolyse modérée par HCl 6 N mais qui est rompue dans des conditions plus sévères.

Nous avons montré que la peptidolipine NA ne réagit pas à la ninhydrine, ce qui est en accord avec le résultat précédent puisque le groupement N-terminal de la chaîne peptidique est engagé dans une fonction amide.

Pour vérifier l'absence de radical NH_2 libre, nous avons fait agir le DNFB en milieu alcalin. L'excès de réactif est éliminé par chromatographie en couches minces sur gel de silice dans le chloroforme selon Mac Farlane (166). Le DNFB est entraîné par le solvant tandis que le produit traité, dinitrophénylé ou non, ne migre pas. Il est élué ensuite par le chloroforme contenant 10 % de méthanol puis hydrolysé par HCl 6 N à 110°. L'hydrolysats ne renferme aucun DNP amino-acide, ce qui confirme l'absence de $-\text{NH}_2$ libre.

Nous avons vu d'autre part que la peptidolipine NA n'a pas de fonction $-\text{COOH}$ titrable par la soude. Les bandes d'absorption de la fonction ester à 1160-1250 et 1740 cm^{-1} dans le spectre infra-rouge laissent supposer que le carboxyle de l'acide C-terminal de la chaîne peptidique estérifie l'un des hydroxyles présents dans la molécule. Par suite, la peptidolipine NA peut avoir l'une des formules partielles suivantes : XVI_A avec la séquence peptidique A ou XVI_B avec la séquence peptidique B (voir chapitre III, page 44).

Pour mettre en évidence la liaison ester nous avons soumis la peptidolipine NA à l'action de l'hydroxylamine et, d'autre part, à une réduction par LiAlH_4 .

Tableau 16

R_F des amino alcools dans le système de solvants XI

Amino alcool	Système XI
Thréoninol	0,26
Alaninol	0,33
Amino alcool inconnu	0,26
Système XI = butanol-acide acétique-eau (77 : 6 : 17)	

B - Formation et identification du DNP amino alcool. On fait agir le dinitrofluorobenzène sur l' amino alcool en milieu alcalin. L'excès de réactif est éliminé par addition de glycocolle ; le DNP amino alcool extrait à l'éther est purifié par chromatographie sur une colonne d'alumine dans l'alcool à 70 % (171).

Généralement, la séparation et l'identification des DNP amino alcools sont effectuées par chromatographie d'adsorption sur Kieselguhr (172) (173), par chromatographie de partage sur colonne de Hyflo-Supercel (169) ou par chromatographie sur papier dans le solvant isooctane-isopropanol-eau (30:7,5:1,5) (174).

La chromatographie sur papier dans ce solvant donne des taches très étalées, aussi avons-nous cherché une autre méthode d'identification qui puisse convenir aux microquantités dont nous disposions. La chromatographie en couches minces sur gel de silice a donné une bonne séparation des DNP thréoninol et alaninol témoins dans le solvant isooctane-isopropanol (31,5:7,5).

Dans ce solvant le DNP amino alcool s'identifie au DNP thréoninol. Les R_F sont indiqués dans le tableau 17.

Tableau 17

R_F des DNP amino alcools dans le système de solvants XII

DNP amino alcool	Système XII
DNP thréoninol	0,25
DNP alaninol	0,36
DNP amino alcool inconnu	0,24
Système XII = isooctane-isopropanol (31,5 : 7,5)	

Ces résultats prouvent qu'une molécule de thréonine est engagée par son carboxyle dans la fonction ester et que la formule partielle de la peptidolipine NA est XVI_A.

Nous l'avons confirmé par saponification ménagée.

4/ Saponification ménagée de la peptidolipine NA - Acide peptidolipique.

La peptidolipine NA traitée par la soude éthanolique 0,1 N à 37° se transforme en un produit acide, l'acide peptidolipique, titrable par la potasse méthanolique et soluble dans le chloroforme.

L'hydrolyse totale fournit une fraction éthérosoluble l'acide 3-hydroxyeicosanoïque et sept moles d'acides aminés, Ala₂, *allo*-Ileu₁, Pro₁, Thr₂, Val₁. L'acide peptidolipique renferme donc tous les constituants de la peptidolipine NA.

C'est une poudre incolore, F. 107-110° [α]_D = - 9,8° (CHCl₃, c = 2,34). PM. titrage 1040 - calculé 981.

Le spectre infrarouge ne présente plus les bandes de la fonction ester. Le spectre ultraviolet mesuré dans l'éthanol est identique à celui de la peptidolipine NA.

Des résultats analogues ont été observés avec d'autres lactones macrocycliques, l'étamycine (72), la staphylomycine S (74) et l'espérine (57) ; ils sont indiqués dans le tableau 18.

La L-thréonine est engagée par son hydroxyle dans la fonction ester de l'étamycine et de la staphylomycine S. Dans les deux cas Sheehan et Vanderhaeghe constatent que le signe de la variation du pouvoir rotatoire est positif, conformément à la règle de Hudson et de Witkop, puisque l'atome de carbone qui porte le groupement OH a la configuration du D glycéraldéhyde (176) (177) (178). La règle de Hudson s'applique aux γ et δ lactones des sucres, Witkop l'adapte à celles des γ et δ hydroxy-aminoacides et la remarque de Sheehan et Vanderhaeghe l'étend aux lactones qui groupent 5 ou 6 acides aminés. La configuration de l'acide 3-hydroxytridécanoïque de l'espérine n'est pas connue. Il devrait selon la règle précédente appartenir à la série L.

La peptidolipine NA peut avoir l'hydroxyle de la L-thréonine ou celui de l'acide 3-hydroxy-eicosanoïque estérifié par le carboxyle de la deuxième molécule de L-thréonine. Dans les deux cas la configuration de l'atome de carbone hydroxylé est celle du D-glycéraldéhyde et le signe de la variation du pouvoir rotatoire est en accord avec la règle de Hudson et Witkop. Il faut noter que la télomycine, qui est également une lactone macrocyclique, fait exception à cette règle : la variation du pouvoir rotatoire est négative (-101°) alors que l'hydroxyle engagé dans la fonction ester appartient à la L-thréonine (75).

Les formules XVI_A de la peptidolipine NA et XVII de l'acide peptidolipique permettent de déterminer celle du peptidolipide Q isolé précédemment après hydrolyse partielle de la peptidolipine NA.

5/ Hydrolyse ménagée de la peptidolipine NA - Peptidolipide Q.

La peptidolipine NA est soumise à une hydrolyse ménagée par un mélange à parties égales d'acide chlorhydrique concentré et d'acide acétique glacial, à 37° pendant six heures. Parmi les produits de dégradation, on sépare par chromatographie préparative sur papier un peptidolipide Q qui renferme tous les constituants de la peptidolipine NA et qui possède un groupement $-NH_2$ et une fonction $-COOH$ libre (chapitre III, page 44).

L'acide aminé N-terminal est déterminé par formation du DNP dérivé. Le rendement est faible mais on identifie la DNP thréonine par chromatographie sur papier dans le solvant phénol-alcool isoamylique-eau (1:1:1), (tableau 19).

Tableau 19

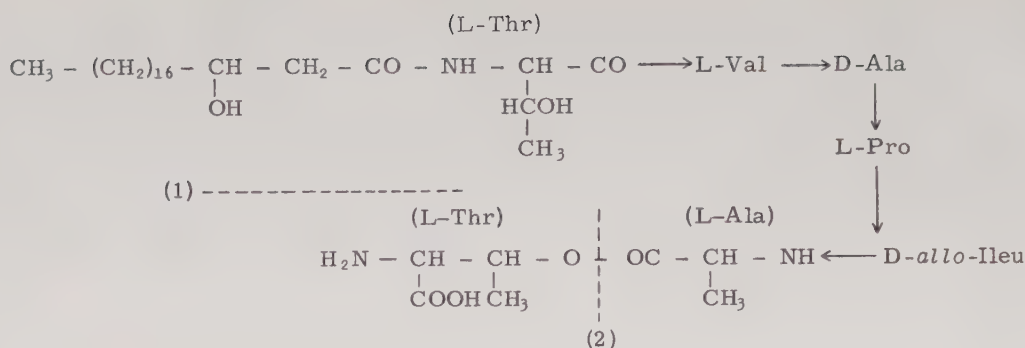
R_F des DNP amino acides dans le système de solvants IX

DNP amino acide	Système IX
DNP-thréonine	0,32
DNP-alanine	0,44
DNP-proline	0,50
DNP-valine	0,60
DNP-isoleucine	0,67
DNP inconnu	0,32
Système IX : phénol-alcool isoamylique-eau (1:1:1)	

L'acide aminé C-terminal est éliminé par réaction de Dakin-West. Après hydrolyse et analyse de l'hydrolysate sur Amberlite CG 120, on trouve six acides aminés : Ala₂, *allo*-Ileu₁, Pro₁, Thr₁, Val₁. Une mole de thréonine a disparu.

Par suite le peptidolipide Q possède une molécule de thréonine N-terminale et une molécule de thréonine C-terminale.

Pour concilier ces résultats avec la formule partielle XVI_A p. 58, il faut admettre que l'hydrolyse acide ménagée ouvre le cycle de la peptidolipine NA en (1) et provoque un réarrangement en (2), ce qui conduit au peptidolipide Q de formule XVIII.



XVIII. Peptidolipide Q.

La même molécule de thréonine est à la fois N-terminale et C-terminale. Remarquons que cette formule explique la présence de thréonine sur les chromatogrammes du peptidolipide Q (chapitre III, p. 36) : la fonction ester créée en (2) entre la thréonine et l'alanine est très labile et s'hydrolyse facilement en libérant une petite quantité de thréonine.

La transformation de la peptidolipine NA en peptidolipide Q par hydrolyse ménagée est une réaction normale. On sait en effet que les acides concentrés provoquent dans les chaînes peptidiques, au niveau des acides aminés hydroxylés, une migration du radical acyle de l'azote vers l'oxygène, c'est la transposition $\text{N} \longrightarrow \text{O}$. Les premières remarques à ce sujet ont été faites par Desnuelle (179). Plus tard, Josefsson et Edman ont signalé l'inactivation réversible du lysozyme et de la ribonucléase, due à une transposition $\text{N} \longrightarrow \text{O}$ par l'acide formique anhydre (180) (181). Indiquons aussi les expériences faites sur la sérine N-acétylée (182) et sur des dipeptides contenant de la sérine ou de la thréonine (183).

En milieu acide la migration $\text{N} \longrightarrow \text{O}$ n'est pas toujours quantitative et s'effectue assez lentement ; le produit obtenu est stable jusqu'à pH 5. Par contre, en milieu alcalin, la transposition inverse $\text{O} \longrightarrow \text{N}$ s'accomplit rapidement et totalement (184).

Nous avons expérimenté cette migration $\text{O} \longrightarrow \text{N}$ par action de la soude 0,1 N sur le peptidolipide Q ; le milieu est neutralisé puis extrait par l'eau et le chloroforme. Les phases aqueuse et chloroformique sont chromatographiées sur papier dans le solvant VIII. La quantité de thréonine libérée dans la phase aqueuse correspond à 1/10 de la quantité théorique calculée pour une saponification complète du composé XVIII, la saponification est donc très limitée. En outre, la phase chloroformique ne réagit plus à la ninhydrine. Ces résultats s'expliquent par le réarrangement $\text{O} \longrightarrow \text{N}$ en milieu alcalin du composé XVIII, au niveau (2), avec formation d'acide peptidolipique qui ne possède plus de fonction ester et qui ne réagit plus à la ninhydrine.

Nous avons d'autre part fait agir la carboxypeptidase sur le peptidolipide Q. Des parties aliquotes prélevées à intervalles de temps réguliers sont chromatographiées dans le solvant VIII. On observe une libération de thréonine qui augmente avec le temps et simultanément une diminution très nette de la réaction du peptidolipide à la ninhydrine. Or l'enzyme agit en milieu alcalin et uniquement sur les liaisons $-\text{CO}-\text{NH}-$. Son action est possible si, dans un premier temps, il y a réarrangement $\text{O} \longrightarrow \text{N}$ en milieu alcalin du composé XVIII en acide peptidolipique XVII. La carboxypeptidase agit alors sur la liaison peptidique reformée entre thréonine et alanine, et libère progressivement la thréonine.

Il faut remarquer enfin que la migration $\text{O} \longrightarrow \text{N}$ en milieu alcalin explique deux résultats déjà mentionnés :

- l'obtention d'une faible quantité de DNP thréonine après réaction de Sanger sur le peptidolipide Q : la réaction a lieu en milieu alcalin et une partie du peptidolipide Q se transforme en acide peptidolipique sur lequel le DNFB ne réagit plus.

- le très faible rendement en peptidolipide Q, après chromatographie sur Dowex 50 X 2 de l'hydrolysate acide partiel de la peptidolipine NA et dessalification des fractions III et IV (chapitre III, page 37) : l'élution du peptidolipide Q s'effectue par un tampon de pH 6,4 et la dessalification par une solution d'ammoniaque. Dans les deux cas, il y a formation d'acide peptidolipique.

II - STRUCTURE COMPLETE DE LA PEPTIDOLIPINE NA

La formule XVI_A de la peptidolipine NA comporte encore une imprécision puisque l'hydroxyle estérifié peut appartenir soit à l'acide D(-) 3-hydroxyeicosanoïque, soit à une molécule de L-thréonine.

1/ Position de l'hydroxyle estérifié.

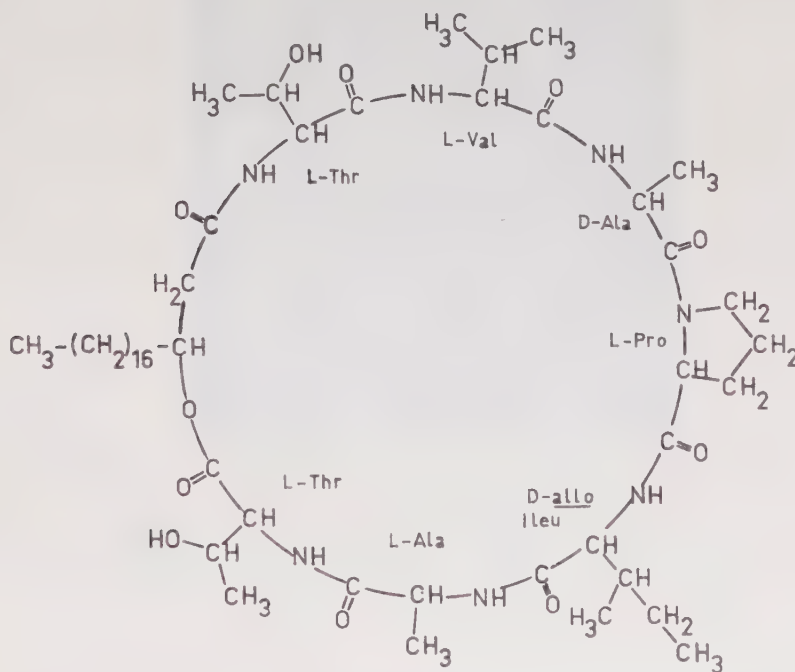
Pour préciser sa structure, nous avons oxydé la peptidolipine NA par l'anhydride chromique à 3 % dans le mélange acide acétique-pyridine (30:1). Cette réaction détruit les hydroxy aminoacides ayant leur hydroxyle libre (72). Nous l'avons expérimenté en oxydant dans les mêmes conditions l'étamycine(*).

Cet antibiotique possède une molécule de thréonine dont l'hydroxyle est engagé dans une liaison ester et une molécule d'*allo*-hydroxyproline dont l'hydroxyle est libre (72) (formule XIII, p. 17).

- l'étamycine oxydée est hydrolysée puis analysée par chromatographie sur papier dans le solvant phénol tamponné au citrate trisodique à 10 % (185). Après révélation à la ninhydrine on retrouve intacte la thréonine, tandis qu'une révélation spécifique à l'isatine et au réactif d'Ehrlich ne permet plus de détecter l'*allo*-hydroxyproline (186).

- la peptidolipine NA oxydée est hydrolysée. Après chromatographie sur papier de l'hydrolysate, on constate la disparition totale de la thréonine ainsi que le montre la figure 27. Par suite les deux molécules de cet acide aminé ont leur hydroxyle libre dans la peptidolipine NA et c'est l'hydroxyle de l'acide 3-hydroxyeicosanoïque qui est estérifié.

La peptidolipine NA a donc la formule XIX.



XIX - Peptidolipine NA

Cette formule a été confirmée par spectrométrie de masse.

(*) Nous remercions Mr. le Pr. J. Sheehan, Institute of Technology, Massachusetts, qui nous a donné un échantillon d'étamycine.

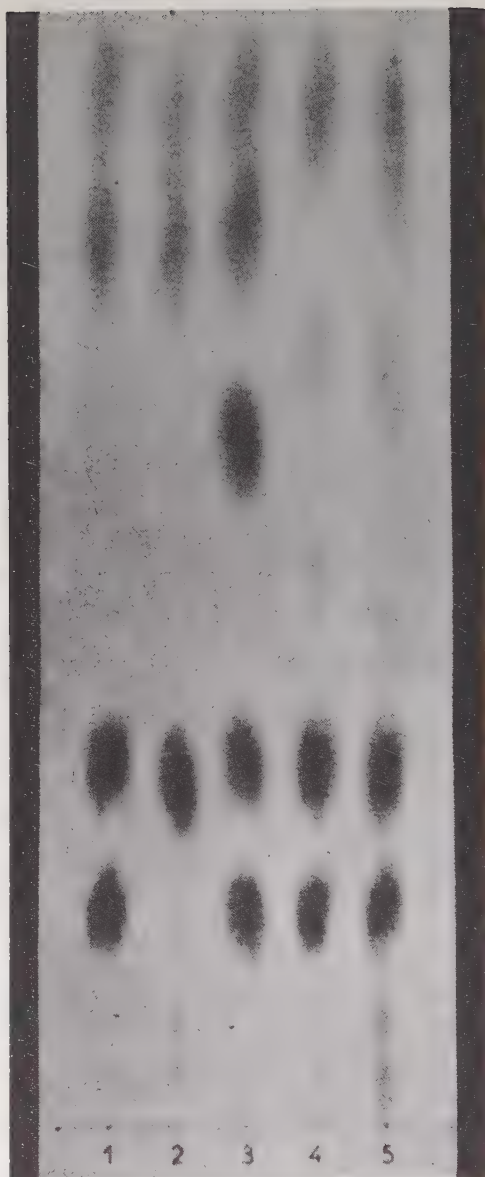


Figure 27 - Oxydation chromique de la peptidolipine NA et de l'étamycine.

1/ Hydrolysats de la peptidolipine NA. 2/ Hydrolysats de la peptidolipine NA après oxydation. 3/ Acides aminés témoins par ordre de R_f croissant : Thr, Ala, acide α -aminobutyrique, Val, Ileu. 4/ Hydrolysats de l'étamycine. 5/ Hydrolysats de l'étamycine après oxydation.

2/ Spectrométrie de masse de la peptidolipine NA et de son éther diméthylrique.

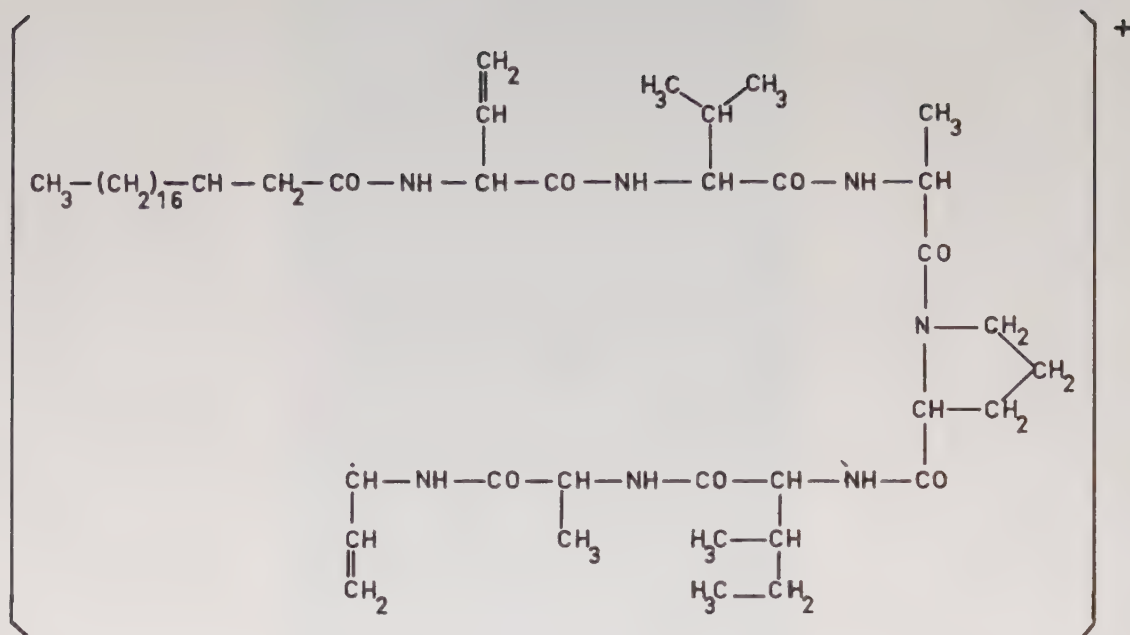
Les spectres et leur interprétation ont été effectués par le Dr. M. Barber (A.E.I., Manchester) (187).

A - Spectre de masse de la peptidolipine NA. Le spectre de masse de la peptidolipine NA indique un poids moléculaire de 963 qui est en accord avec la formule $C_{50}H_{89}N_7O_{11}$. Il présente en outre des pics qui proviennent d'une dégradation progressive de la molécule et qui confirment la séquence peptidique (figure 28).

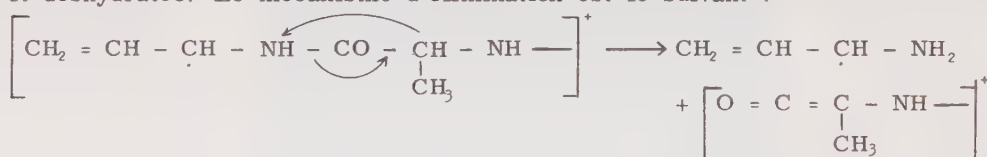
Le pic à m/e 963 correspond à la molécule entière. Le pic relativement intense à m/e 919 ($963 - 44$) indique le départ d'une molécule de CH_3CHO . Le pic à m/e 883 est dû à la perte d'une molécule de CO_2 et de deux molécules d'eau, ce qui conduit au composé suivant :



Figure 28 - Spectre de masse de la peptidolipine NA.



On observe ensuite un pic à m/e 827 (883-56) correspondant au départ de la thréonine décarboxylée et déshydratée. Le mécanisme d'élimination est le suivant :



Les pics à m/e 756, 643, 546, 475, 376 et 293 correspondent aux départs successifs des résidus d'acides aminés : Ala, *allo*-Ileu, Pro, Ala, Val, Thr, suivant le mécanisme précédent :



On observe en outre des pics à m/e 728 (756-28), 447 (475-28) et 348 (376-28) correspondant au départ de CO.

On confirme ainsi la séquence peptidique et le dernier pic à m/e 293 est dû au résidu acyle : $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{16} - \text{CH} = \text{CH} - \text{C} = \text{O}$.

B - Spectre de masse de l'éther diméthylrique. La peptidolipine NA est méthylée selon la méthode déjà décrite (175). Le produit obtenu, chromatographié sur acide silicique est élué par le chloroforme contenant 2 % de méthanol, F. 210-213°.

L'analyse élémentaire donne : % C 62,36 H 9,36 N 9,85 O(CH₃) 1,96. Calculé pour C₅₂H₉₃N₇O₁₁ % C 62,93 H 9,44 N 9,88 O(CH₃) 3,03. P.M. 991. P.M. obtenu par spectrométrie de masse : 991. Le spectre présente des pics à m/e 933 et 875 indiquant la perte de 58 et 2 x 58 unités de masse correspondant aux deux groupements : $-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}} - \text{CH}_3$, des deux chaînes latérales de la thréonine O-méthylée.

CHAPITRE VI

DESCRIPTION DES EXPÉRIENCES

I - TECHNIQUES GENERALES

Nous avons utilisé des techniques de fractionnement et des techniques analytiques.

1/ Séparations chromatographiques.

A - Chromatographies d'adsorption sur colonne. Nous avons employé différents adsorbants : alumine neutre d'activité II, acide silicique Mallinckrodt et trisilicate de magnésium Siegfried activés au préalable par chauffage à 120° pendant 24 heures. Ces derniers sont utilisés en mélange avec la célite 545 (proportions 2 : 1).

B - Chromatographies en couches minces. Les plaques de 0,25 mm d'épaisseur et de 200 x 100 mm ou 200 x 200 mm sont préparées sur l'appareil Desaga avec le gel de silice G Merck. Elles sont activées 2 heures à 120°.

C - Chromatographies sur papier. Les chromatographies monodimensionnelles et bidimensionnelles sont effectuées sur papier Whatman n° 1 ; pour les chromatographies préparatives le papier Whatman n° 3 MM a parfois été utilisé. Lorsque la chromatographie a lieu avec un solvant tamponné le papier est imprégné au préalable par le tampon correspondant.

D - Chromatographies par échange d'ions. Différents échangeurs d'ions sont utilisés : le Dowex 50 X 2 pour les chromatographies préparatives de peptides, le Dowex 50 X 4 et l'Amberlite CG 120 pour l'analyse quantitative des acides aminés. La résine est équilibrée avec un tampon approprié. Le mélange de peptides ou d'acides aminés est introduit sur la colonne dans le même tampon. L'élution est réalisée en modifiant graduellement le pH et la force ionique du tampon et éventuellement la température.

On emploie des colonnes en verre de 150 cm x 1,8 cm pour la séparation des peptides et de 120 cm x 0,9 cm pour le dosage des acides aminés. Ces colonnes sont maintenues à température constante par circulation d'eau dans une double paroi. Un collecteur de fractions permet de recueillir les éluats par fractions de 1 à 10 ml grâce à une électrode mobile.

E - Dessalifications sur échangeurs d'ions. Elles ont lieu soit sur un échangeur de cations le Dowex 50 X 2 soit sur un échangeur d'anions le Dowex 2.

- Dessalifications sur échangeur de cations : Le Dowex 50 X 2 est utilisé sous sa forme acide. Les acides aminés et les peptides se fixent sur la résine ainsi que les cations minéraux, tandis que les anions minéraux et les substances non ionisées passent dans le filtrat. On élue quantitativement les acides aminés et les peptides par une solution d'ammoniaque N les cations minéraux restant fixés sur la résine. La première fraction alcaline renferme la plus grande partie du produit dessalifié. La régénération de la résine se fait par lavages successifs avec HCl 4 N, NH₄OH 2 N, et acide citrique 0,1 M.

- Dessalifications sur échangeur d'anions : Le Dowex 2 est utilisé sous sa forme alcaline. On élue quantitativement les acides aminés avec l'acide acétique N. La première fraction acide contient le produit dessalifié. La résine est régénérée par des lavages avec HCl Net NaOH 2 N.

F - Chromatographies en phase gazeuse. Les chromatographies en phase gazeuse sont effectuées avec un appareil Aerograph A 90-P muni d'une cellule de détection à résistances. Les co-

lonnes ont une longueur de 1,50 m et un diamètre intérieur de 6,25 mm. Plusieurs phases stationnaires sont employées :

Diéthylène glycol succinate (DEGS) 20 %

Apiezon M 20 %

Apiezon L 20 %

Silicone SE30 3 %

Silicone rubber 20 %

Dans tous les cas le support est la fire-brick 60-80 mesh.

Quelques chromatographies préparatives ont été réalisées avec un Aerograph Autoprep A 700 et une colonne d'Apiezon L 20 % de longueur 3,20 m et de diamètre intérieur 9,5 mm. Le gaz vecteur est l'hélium avec un débit de 50 à 60 ml par minute.

2/ Séparations par contre courant.

Le modèle automatique Towers est composé de 120 tubes d'une contenance de 80 ml, disposés en deux rangées. Un système automatique fait basculer l'ensemble de l'appareil suivant un rythme d'agitation et de décantation choisi au préalable. A chaque transfert 40 ml de la phase supérieure du solvant sont ajoutés au premier tube par l'intermédiaire d'un siphon. La série de retraits des phases supérieures est recueillie avec un collecteur automatique Towers CL 450.

3/ Techniques analytiques.

Les microanalyses ont été effectuées en partie dans le laboratoire microanalytique de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles, en partie dans le laboratoire microanalytique de la Ciba (Bâle).

C'est à l'aide du microscope à platine chauffante de Köfler que nous avons déterminé les points de fusion.

Pour les dosages d'acidité nous avons utilisé une microburette Gilmont graduée en μ l. Les échantillons (1 à 2 mg) solubilisés dans le chloroforme neutralisé sont titrés par une solution méthanolique de potasse N/100, en présence de phénol phtaléine.

Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés avec un polarimètre électronique Roussel-Jouan.

Les spectres de masse ont été effectués soit à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles sur appareil Atlas CH-4 soit aux "Associated Electrical Industries" de Manchester sur un appareil MS 9.

Les spectres infrarouge et ultraviolet ont été relevés sur des spectrophotomètres Perkin-Elmer, les spectres RMN sur un appareil Variant A-60.

II - FRACTIONNEMENT DES PEPTIDOLIPIDES

Les peptidolipides obtenus à partir de l'extract éthéro-alcoolique de *Nocardia asteroides* ATCC 9969 (tableau 1, page 21) sont chromatographiés sur différents adsorbants.

1/ Chromatographie sur acide silicique Mallinckrodt.

Chromatographie n° 1

Peptidolipides	* 5054 mg
Acide silicique	150 g
Célite	75 g
Elution par fractions de	200 ml

Fraction	Solvant	Poids (mg)
1	Chloroforme	11
2	"	19
3	"	25
4	"	15
5	"	9
6	"	7
7	"	1
8	Chloroforme-méthanol (98:2)	0
9	"	2
10	Chloroforme-méthanol (95:5)	0
11	"	301
12	"	4519
13	"	121
14	"	15
Total		5045

Le chloroforme contenant 5 % de méthanol élue une seule fraction principale, qui est étudiée (éluats n° 11, 12 et 13).

A - Etude qualitative des acides aminés.

- Hydrolyse des peptidolipides. 11 mg sont hydrolysés par 0,5 ml de HCl 6 N, en tube scellé à 110° pendant 40 heures. La partie lipidique est extraite à l'éther ; la partie hydrosoluble, évaporée à sec sous vide sur chlorure de calcium et potasse, est ajustée à 5 ml avec de l'eau.

- Chromatographies sur papier. Nous avons effectué des chromatographies bidimensionnelles et monodimensionnelles. Dans le premier cas on chromatographie 50 µl de l'hydrolysate des peptidolipides et 0,05 µM de chacun des amino-acides témoins dans les solvants I, II, III, IV (page 23).

Après révélation à la ninhydrine, on décèle cinq taches correspondant à Thr, Ala, Pro, Val et Leu ; leur coloration plus intense que celle des témoins indique une concentration supérieure à 0,05 µM dans la prise d'essai.

Une chromatographie monodimensionnelle préparative a été effectuée sur 100 µl de l'hydrolysate dans butanol-acide formique-eau (75:15:10), on élue les bandes 1 au niveau de Thr, 2 au niveau de Ala et Pro, 3 au niveau de Leu. Chaque éluat est examiné par chromatographie dans un solvant plus sélectif : phénol tamponné à différents pH selon Mac Farren (87).

Une fraction de l'éluat 1 est chromatographiée en présence de 0,05 µM d'acides aminés témoins dans le phénol tamponné à pH 10. On révèle à la ninhydrine ou par le réactif périodate-benzidine.

Une fraction de l'éluat 2 est chromatographiée dans le phénol tamponné à pH 4 en présence de 0,05 µM d'alanine, de proline et de tyrosine. La partie inférieure du chromatogramme est révélée à la ninhydrine, la partie supérieure par une solution d'isatine à 0,2 % dans butanol-acide acétique (100:25) ; la proline apparaît en bleu.

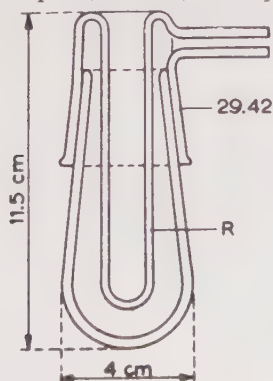


Figure 29 - Appareil de sublimation pour la séparation du dinitrophénol. (122).

- DNP dérivés des amino acides des peptidolipides. Par chromatographies préparatives de 500 µl de l'hydrolysate dans le solvant de Wolfe (86), puis dans butanol-acide formique-eau (75:15:10) pour séparer thréonine et *allo*-isoleucine, on isole 1 µM de chacun des acides aminés. Les DNP dérivés sont préparés suivant la microméthode de Sanger (188) ; l'acide aminé est dissous dans 0,1 ml d'eau et on ajoute 10 µl de DNFB en solution dans 0,2 ml d'alcool. On ajuste le pH entre 8 et 9 avec une solution de triméthylamine à 1 %. Le mélange est agité pendant quatre heures, puis l'excès de DNFB est extrait trois fois à l'éther exempt de peroxyde. L'extrait aqueux est concentré sur potasse et acide sulfurique. On reprend à l'eau, on acidifie et on extrait le DNP dérivé à l'éther. L'élimination du dinitrophénol se fait par sublimation à 70-80° dans l'appareil représenté sur la figure 29. Le réfrigérant R est rempli par le mélange acétone + neige carbonique (122).

- Synthèse des DNP dérivés témoins (99). A 100 mg d'acide aminé, on ajoute 2,5 ml de NaHCO_3 à 8 % et 200 mg de DNFB dissous dans 5 ml d'éthanol. Le mélange est agité pendant deux heures à température ambiante. L'alcool est évaporé et l'excès de DNFB est extrait à l'éther exempt de peroxyde. La solution aqueuse est acidifiée. Le DNP acide aminé précipite, on le sépare par filtration. On prépare ainsi : DNP valine, DNP alanine, DNP proline, DNP thréonine et DNP isoleucine.

On chromatographie 0,02 μM de chacun des dérivés dinitrophénylés dans le tampon phosphate pH 6, obtenu en dissolvant 156 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ et 89 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ dans un litre d'eau (100).

B - Etude quantitative des acides aminés (101). La résine Dowex 50 X 4, après lavage à l'eau distillée et à la soude normale, est mise en suspension dans un tampon 0,2 N de pH 5,1, puis introduite dans la colonne par portions successives. Elle est lavée par la soude 0,2 N puis tamponnée à pH 3,1.

On concentre 2,5 ml de l'hydrolysât des peptidolipides que l'on reprend par 2,5 ml de tampon 0,2 N de pH 3,1 et on le charge sur la colonne. La chromatographie est effectuée à 30°. On recueille l'éluât par fractions de 1 ml. Les solutions tampons utilisées sont décrites dans le tableau 20. Les normalités sont calculées par rapport à la concentration en Na^+ .

Tableau 20

Solutions tampons utilisées pour la chromatographie sur Dowex 50 X 4

pH	N	Acide citrique (g/l)	Acide acétique glacial (g/l)	NaOH (g/l)	Acétate de sodium $3\text{H}_2\text{O}$ (g/l)	HCl (ml/l)	Brij (ml/l)
3,1	0,2	21		8,3		11,55	5
5,1	2	105	21,5	47	136		1

Nous avons effectué le dosage colorimétrique de Moore et Stein (102).

- Réactif. 1 ml de réactif contient 20 mg de ninhydrine et 3 mg d'hydrindantine dissous dans 0,75 ml de méthylcellosolve et 0,25 ml d'une solution aqueuse d'acétate de sodium 4 M et de pH 5,5 (54,4 g d'acétate de sodium et 10 ml d'acide acétique glacial dilués à 100 ml).

Le méthylcellosolve est distillé sur chlorure stanneux.

L'hydrindantine est préparée par réduction de la ninhydrine : 5 g de ninhydrine sont dissous dans 125 ml d'eau à 90°. 5 g d'acide ascorbique sont dissous dans 25 ml d'eau à 40°. On ajoute peu à peu la deuxième solution à la première. Le précipité, refroidi, est filtré lavé à l'eau puis séché. On le conserve à l'abri de la lumière.

- Dosage. Après addition de 1 ml de réactif et chauffage pendant un quart d'heure au bain-marie bouillant, chaque fraction est diluée avec 5 ml d'alcool à 50 % et la coloration obtenue est lue au spectrophotomètre à 570 m μ .

Pour la proline, nous avons utilisé la méthode de Chinard (103) avec un réactif qui contient 25 mg de ninhydrine dans 0,4 ml d'acide phosphorique 6 M et 0,6 ml d'acide acétique glacial. A chaque ml de la solution à doser on ajoute 1 ml d'acide acétique glacial et 1 ml de réactif. On chauffe 1 heure à 100°, on dilue par 2 ml d'acide acétique concentré et on lit la coloration à 515 m μ . Les densités optiques sont traduites en μ moles de proline au moyen d'une courbe témoin.

- Calcul. On ramène toutes les densités optiques à celle de la leucine au moyen des coefficients k calculés par Moore et Stein (102). On obtient les colorations corrigées C_c que l'on transforme en μ moles d'acide aminé, la coloration d'une μ mole de leucine étant 2620.

Le résultat du dosage est exprimé dans le tableau 21.

Tableau 21
Analyse quantitative des amino acides des peptidolipides

Acide aminé	k	C _c	μ moles	Proportions molaires
Thréonine	0,94	18.165	6,95	4
Alanine	0,97	16.900	6,5	4
Valine	0,97	12.000	4,6	3
<i>allo</i> -Isoleucine	1,00	8.550	3,25	2
Leucine	1,00	1.200		
Proline		13.624	5,2	3

2/ Chromatographie sur trisilicate de magnésium.

Chromatographie n° 2

Peptidolipides	4.970 mg
Trisilicate de magnésium	150 g
Célite	75 g
Elution par fractions de	250 ml

Fractions	Solvant	Poids (mg)
1	Chloroforme	34
2	"	1466
3	"	703
4	"	711
5	"	195
6	"	116
7	"	41
8	"	31
9	"	17
10	"	15
11	Chloroforme-méthanol (95:5)	5
12	"	1198
13	"	222
14	"	44
15	"	26
16	"	} 46
17	"	
18 à 21	Chloroforme-méthanol (90:10)	50
Total		4920

Le chloroforme élue la fraction I - Le chloroforme contenant 5 % de méthanol élue la fraction II.

A - Poids moléculaire de la fraction II. Pour de faibles concentrations, le poids moléculaire est inversement proportionnel à la pression osmotique. Si deux solutions placées dans un tube capillaire ont une tension de vapeur différente, le volume de la solution la plus concentrée augmente aux dépens de l'autre. Pour déterminer le poids moléculaire de la fraction II, on étudie les variations de volume d'une solution chloroformique de cette fraction par rapport à des solutions chloroformiques de naphthalène de molarités différentes (104) (105). Les deux solutions à comparer sont introduites dans un tube capillaire de 1 mm de diamètre et de 10 cm de long. Les tubes sont scellés aux deux extrémités, fixés sur une lame de microscope puis immergés dans un bain d'eau thermostatique. On observe au comparateur micrométrique le déplacement du ménisque de la solution analysée par rapport à un trait de repère fixe tracé sur la lame.

Si le déplacement du ménisque est positif, la concentration molaire de la solution analysée est supérieure à celle de la solution témoin. Elle est inférieure si le déplacement du ménisque est négatif.

La concentration de la fraction II est de 31 mg dans 1 ml de chloroforme. Les solutions témoins sont préparées à partir d'une solution 0,04 M de naphthalène.

Le résultat de cette détermination est indiqué dans le tableau 22.

Tableau 22
Poids moléculaire de la fraction II

Molarité des solutions de naphthalène	0,016	0,017	0,018	0,019	0,020	0,021	0,022	0,023	0,024
Signe du déplacement	+	+	+	+	+	+	-	-	-
P. M.	<1940	<1825	<1725	<1630	<1550	<1475	>1410	>1350	>1290

Le poids moléculaire est donc voisin de 1450.

B - Analyse quantitative des acides aminés de la fraction II (114).

L'Amberlite CG 120, lavée à l'eau distillée puis à la soude 0,2 N, est mise en suspension dans un tampon 0,2 N de pH 4,25 puis introduite dans la colonne. Elle est ensuite lavée par la soude 0,2 N contenant 0,5 % de Brij puis tamponnée à pH 3,25.

1,3 mg de la fraction II sont hydrolysés, repris par 1 ml de tampon 0,2 N, pH 3,25 puis chargés sur la colonne. La chromatographie a lieu à 50°. Après l'élution de l'alanine, on poursuit la chromatographie avec le tampon 0,2 N de pH 4,25 (tableau 23).

Tableau 23
Solutions tampons utilisées pour la chromatographie sur Amberlite CG 120

pH	N	Acide citrique (g/l)	NaOH (g/l)	HCl (ml/l)	Brij (ml/l)
3,25	0,2	21	8,25	10,65	5
4,25	0,2	21	8,25	4,7	5

Les dosages sont effectués par la ninhydrine selon la méthode déjà décrite et les colorations sont traduites en μ moles d'acide aminé au moyen de courbes témoins établies pour la leucine et la proline. Avec le spectrophotomètre Jouan, 1 μ M de leucine donne une coloration de 3.530 et 1 μ M de proline une coloration de 3.160. Le résultat du dosage est indiqué dans le tableau 24.

Tableau 24
Analyse quantitative des acides aminés de la fraction II

Acide aminé	k	C _c	μ moles	Proportions molaires
Thr	0,92	8090	2,3	4
Ala	0,94	7380	2,1	4
Val	0,98	5760	1,63	3
allo-Ileu	0,99	4510	1,28	2
Pro		4400	1,39	2

3/ Distribution à contre courant.

A - Essai n° 1 dans le système de solvants A : Hexane-tétrachlorure de carbone-méthanol-eau (3,1:3,1:3,8:0,3). 5,086 g de peptidolipides sont dissous dans 400 ml de la phase supérieure puis répartis dans les dix premiers tubes de l'appareil. La série fondamentale de 119 transferts est complétée par une série de retraits de 129 phases supérieures prélevées à l'aide d'un collecteur automatique de fractions ; le résultat est indiqué figure 2, page 30.

Les fractions 55 à 85 de la série de retraits (48 % du produit initial) sont réunies et étudiées.

- le poids moléculaire est indiqué dans le tableau 25, il est voisin de 1100. La concentration de la solution analysée est de 30 mg/ml.

Tableau 25

Poids moléculaire du produit obtenu après distribution à contre courant (essai n° 1)

Molarité des solutions de naphthalène	0,020	0,021	0,022	0,023	0,024	0,025	0,026	0,027	0,028	0,029
Signe du déplacement	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
P. M.	<1500	<1430	<1360	<1300	<1250	<1200	<1150	<1110	>1070	>1030

- On hydrolyse 1,6 mg - L'hydrolysate est analysé sur Amberlite CG 120 (tableau 26).

Tableau 26

Analyse quantitative des acides aminés du produit obtenu après distribution à contre courant, essai n° 1.

Acide aminé	C _e	μ moles	Proportions molaires
Thréonine	12.290	3,5	2
Alanine	13.880	3,95	2
Valine	6.180	1,75	1
allo-Isoleucine	6.330	1,8	1
Proline	4.970	1,58	1

B - Essai n° 2. 2,446 g des fractions 55 à 85 de l'essai n° 1 sont soumises à une nouvelle séparation dans les conditions précédentes.

Les fractions 63, 74 et 84 de la série de retraits ont été étudiées.

Le poids moléculaire de la fraction 63 est indiqué dans le tableau 27. La concentration de la solution analysée est de 33,5 mg/ml.

Tableau 27

Poids moléculaire de la fraction 63

Molarité des solutions de naphthalène	0,017	0,019	0,020	0,028	0,030	0,032	0,035	0,037
Signe du déplacement	+	+	+	+	0	-	-	-
P. M.	< 1970	< 1760	< 1675	< 1195	1115	> 1045	> 960	> 905

III - ETUDE DE LA FRACTION PEPTIDIQUE DE LA PEPTIDOLIPINE NA

1/ Analyse quantitative des acides aminés (tableau 28).

On hydrolyse 1,2 mg de peptidolipine NA ; on chromatographie l'hydrolysate sur Amberlite CG 120.

Tableau 28

Analyse quantitative des acides aminés de la peptidolipine NA

Acide aminé	C _e	μ moles	Proportions molaires
Thréonine	8.420	2,4	2
Alanine	8.635	2,45	2
Valine	5.250	1,5	1
<i>allo</i> -Isoleucine	4.170	1,2	1
Proline	4.485	1,4	1

2/ Hydrolyse acide partielle.

A - Hydrolyse. 440 mg de peptidolipine NA dissous dans 4 ml d'acide acétique glacial sont hydrolysés à 37° par 4 ml d'acide chlorhydrique concentré, pendant 6 heures. Les acides sont évaporés sous vide sur KOH. Le résidu est extrait à l'eau et à l'éther. On obtient 14 mg, soit 3 % seulement de fraction éthérosoluble.

B - Chromatographie sur Dowex 50 X 2. On traite plusieurs fois le sel de sodium de la résine par une solution tampon 0,2 N de pH 5,1. Le Dowex 50 X 2 est introduit dans la colonne puis lavé avec de la soude 0,2 N contenant 0,5 % d'une solution de Brij. On le tamponne ensuite à pH 3,1.

420 mg de l'hydrolysate partiel repris par quelques ml de tampon 0,2 N, pH 3,1 sont introduits sur la colonne et la chromatographie débute à ce pH. On recueille des fractions de 6 ml.

Le tampon 2 N, pH 6,4 est obtenu en dissolvant 272 g d'acétate de sodium dans un litre d'eau et en ajoutant 1,5 ml d'acide acétique glacial. Les autres solutions tampons ont été décrites p. 70 dans le tableau 20.

La figure 8 page 37 indique la marche de la chromatographie.

Pour localiser les différents constituants, nous avons effectué des dosages à la ninhydrine après hydrolyses alcalines. A 0,2 ml de chaque fraction paire, nous ajoutons 2,5 ml de soude 2,5 N. Le mélange est chauffé pendant 2h30 dans un bain d'huile à 90°. L'addition de 1 ml d'acide acétique à 30 % neutralise la soude et ramène le pH à 5. Le dosage est poursuivi suivant la méthode habituelle.

Les fractions 190 à 215 sont réunies et dessalifiées sur une colonne de Dowex 50 X 2. On recueille 40 mg de peptide P.

C - Etude du peptide P. On hydrolyse 1,3 mg et on dose les acides aminés sur Amberlite CG 120 (tableau 29).

Tableau 29

Analyse quantitative des amino acides du peptide P.

Acide aminé	C _e	μ moles	Proportions molaires
Thréonine	4.950	1,4	2
Alanine	10.090	2,8	2
Valine	4.550	1,3	1
<i>allo</i> -Isoleucine	4.610	1,3	1
Proline	4.310	1,36	1

Par la microméthode de Sanger décrite page 69 et effectuée sur 1 μ M du peptide P (0,6 mg), on identifie l'acide aminé N-terminal à la thréonine. Par la réaction de Dakin-West on détermine l'acide aminé C-terminal (alanine).

- Réaction de Dakin-West (128) : 0,7 mg en solution dans 0,5 ml du mélange anhydride acétique-pyridine (3:2) sont chauffés à 80° pendant 6h30 sous courant d'azote. On ajoute 0,2 ml d'eau et on évapore sous vide. On reprend plusieurs fois par l'eau, on évapore à sec, puis le résidu est hydrolysé par HCl 6 N. L'hydrolysate est à nouveau concentré sous vide et repris plusieurs fois par l'eau. On ajoute enfin 1 ml d'ammoniaque 0,5 N que l'on évapore après 20 minutes et le produit de la réaction est chromatographié sur Amberlite CG 120 (tableau 30).

Tableau 30

Analyse quantitative des acides aminés du peptide P après réaction de Dakin-West

Acide aminé	C _c	μ moles	Proportions molaires
Thréonine	2.250	0,64	1
Alanine	2.735	0,77	1
* Valine	2.280	0,65	1
<i>allo</i> -Isoleucine	2.105	0,60	1
Proline	1.970	0,62	1

Afin de poursuivre l'étude du peptide P, on le soumet à une hydrolyse partielle : 20 mg sont traités par 2 ml d'HCl concentré à 37° pendant 72 heures. L'hydrolysate contient un mélange de trois peptides P_a, P_b, et P qui sont isolés par chromatographies préparatives sur papier (voir p. 39).

La moitié du peptide P_a est hydrolysée par HCl 6 N ; l'hydrolysate est divisé en deux parties, l'une est chromatographiée sur Amberlite CG 120 (tableau 31) et l'autre est soumise à l'action de la D-amino acide oxydase en milieu tampon pyrophosphate 0,1 M, pH 8,2, en présence de FAD (129).

Tableau 31

Analyse quantitative des acides aminés du peptide P_a

Acide aminé	C _c	μ moles	Proportions molaires
Thréonine	3.390	0,96	1
Alanine	3.910	1,06	1
Valine	3.480	0,98	1

- Action de la D-aminoacide oxydase. Le tampon pyrophosphate 0,1 M de pH 8,2 est obtenu en dissolvant dans l'eau 8,9 g de Na₄P₂O₇ · 10 H₂O, on ajoute 6 ml de HCl N et on complète à 200 ml. Le pH est ensuite ajusté à 8,2 par HCl concentré.

La solution de FAD est à 1 mg pour 10 ml de tampon.

L'hydrolysate de P_a est repris par 0,25 ml de tampon et 0,25 ml de la solution de FAD. On ajoute 2 mg de D-aminoacide oxydase et on laisse à 37° pendant six heures. On dessalifie sur Dowex 2 et le produit obtenu est chromatographié sur papier dans le solvant VIII.

L'étude de P_b est conduite de la même façon. Nous donnons seulement les résultats du dosage des acides aminés après chromatographie sur Amberlite CG 120 d'un hydrolysate de P_b (tableau 32)

Tableau 32

Analyse quantitative des acides aminés du peptide P_b

Acide aminé	C _c	μ moles	Proportions molaires
Alanine	2.200	0,62	1
<i>allo</i> -Isoleucine	2.150	0,61	1
Proline	2.010	0,64	1

La structure de l'hexapeptide P a été vérifiée par la réaction d'Edman (131).

- Action du phénylisothiocyanate sur le peptide P. 3 mg (soit $\sim 5 \mu\text{M}$) sont dissous dans 4 ml de dioxanne aqueux à 50 %. Après addition de 0,1 ml de phénylisothiocyanate, on ajuste le pH à 9 avec la triméthylamine aqueuse à 5 % puis on soumet le mélange à une agitation magnétique à 40° pendant 1h30. On extrait l'excès de réactif au cyclohexane (deux fois) et au benzène (six fois) en maintenant un pH alcalin. On concentre la solution aqueuse sous vide. Le résidu est repris par 10 ml d'eau et 40 ml de HCl 4 N. On obtient ainsi une solution approximativement 3 N, de concentration 0,1 $\mu\text{M}/\text{ml}$, dont on lit l'absorption ultraviolette en fonction du temps (figure 14 page 42). Le PTH amino acide libéré au bout de trois heures est extrait par l'acétate d'éthyle. On répète deux fois la réaction d'Edman et les trois PTH amino acides isolés sont identifiés par chromatographie en couches minces en présence de témoins.

- Synthèse de PTH amino acides témoins (131). 0,3 mM de l'acide amino et une quantité équimoléculaire de Na_2CO_3 pur et sec (35 mg) sont dissous dans 3 ml de dioxanne à 50 %. On ajoute 0,05 ml de phénylisothiocyanate et on abandonne le mélange à 40° sous agitation magnétique pendant deux heures. L'excès de réactif est extrait au cyclohexane (deux fois) puis au benzène (quatre fois). Le milieu est acidifié puis abandonné à nouveau deux heures à 40°.

Le précipité formé est filtré, lavé à l'eau puis reprécipité dans l'acide acétique à 30 % ou dans l'éthanol.

On prépare les PTH valine, PTH thréonine, PTH alanine, PTH isoleucine, et PTH proline.

- Chromatographie en couches minces des PTH aminoacides (132). On chromatographie 0,002 μM des différents PTH aminoacides dans le solvant heptane-pyridine-acétate d'éthyle (5:3:2). Pour la révélation on utilise les trois réactifs suivants :

- solution aqueuse d'amidon à 0,5 % (500 mg pour 100 ml d'eau)
- solution aqueuse d'iode 0,01 M et d'iodure de potassium 0,5 M (63,5 mg d'iode et 4,15 g d'iodure de potassium pour 50 ml d'eau).
- solution aqueuse d'azide de sodium M/2 (1,625 g pour 50 ml d'eau).

On asperge les plaques avec la solution d'amidon puis on vaporise un mélange, à parties égales, des solutions d'iode et d'azide de sodium. Les PTH acides aminés apparaissent en blanc sur fond violet.

IV - ETUDE DE LA FRACTION LIPIDIQUE DE LA PEPTIDOLIPINE NA

1/ Hydrolyse de la peptidolipine NA par HCl 6 N.

1,510 g de peptidolipine NA sont hydrolysés par 6 ml de HCl 6 N sous pression à 115° pendant 72 heures. La partie lipidique, 498 mg soit 33 %, est extraite à l'éther et méthylée par le diazométhane gazeux obtenu par action de la potasse sur la nitrosométhylurée (133).

L'ester M_I est purifié par chromatographie préparative en phase gazeuse sur colonne de DEGS à 212°.

A - Réduction de M_I (135). 10 mg de M_I en solution dans 3 ml de diéthylène glycol contenant une pastille de potasse sont réduits par 0,5 ml d'hydrazine, à 166°, sous reflux pendant 13 heures. La solution est concentrée et le mélange placé à nouveau sous reflux à 180° pendant 3/4 d'heure. Après refroidissement et acidification par HCl 3 N, l'éther extrait 10 mg d'un produit que l'on estérifie et que l'on purifie par chromatographie sur acide silicique et élution par le benzène.

B - Oxydation de M_I (138) 10 mg de M_I en solution dans 6 ml de butanol tertiaire sont agités pendant 6 heures à 37° avec 4 ml de Na_2CO_3 0,1 M et 8 ml d'une solution d'oxydant contenant 0,018 M de NaIO_4 et 0,025 M de KMnO_4 (soit respectivement 3,85 et 0,395 g/l). La réaction est arrêtée par addition de bisulfite de sodium et le milieu est alcalinisé par une pastille de potasse. Le butanol tertiaire et l'eau sont évaporés sous vide à 50°. Le résidu repris par quelques ml d'eau est acidifié par H_2SO_4 6 N et l'acide est extrait à l'éther. La solution étherée est séchée sur Na_2SO_4 puis estérifiée.

2/ Synthèse de l'acide 2-trans-eicosénoïque.

A - Préparation du stéaraldéhyde à partir du chlorure de stéaryle. Le chlorure de thionyle est distillé sur quinoléine et huile de lin (141).

- L'acide stéarique est reprecipité dans l'acétone.
- le xylène est distillé et conservé sur sodium
- Le catalyseur, Pd sur sulfate de baryum, est préparé selon la méthode de Mosettig (144).

- 6,081 g d'acide stéarique (21,4 mM) sont introduits dans un ballon surmonté d'un réfrigérant et d'une ampoule à brome contenant 3 ml de SOCl_2 . Le chlorure de thionyle tombe goutte à goutte sur l'acide stéarique maintenu à 80° dans un bain d'huile. Après addition de la totalité du réactif, on chauffe encore deux heures à 95° puis l'excès de chlorure de thionyle est éliminé sous vide. Le produit obtenu est dissous dans 20 ml de xylène. On ajoute 1,824 g de catalyseur, puis on fait arriver un violent courant d' H_2 gazeux et sec dans le mélange.

La vitesse de la réaction est contrôlée par titrage de l'acide chlorhydrique dégagé. On arrête la réduction dès que cesse le dégagement. En deux heures 20,5 ml de NaOH N sont utilisés. Le rendement est de 97 %.

- Purification du stéaraldéhyde. 5,236 g du produit de la réduction précédente sont dissous dans 70 ml d'éther puis traités par 100 ml d'une solution concentrée de bisulfite de sodium. On laisse sous agitation magnétique pendant 48 heures puis on filtre. Le précipité lavé à l'éther est traité par une solution aqueuse de Na_2CO_3 à 15 % et l'aldéhyde est extrait à l'éther (2,207 g). F. 39° ; F. de l'aldéhyde stéarique authentique : 38° . Le rendement par rapport à l'acide stéarique est de 41 %.

B - Préparation du stéaraldéhyde à partir de l'octadécanol (147). Dans un ballon rodé, on mélange 2,7 g d'octadécanol (10 mM), 6,2 g de dicyclohexylcarbodiimide (30 mM) et 0,5 g d'acide phosphorique cristallisé (5 mM). On ajoute 35 ml de diméthylsulfoxyde et on place sous agitation magnétique à température ambiante pendant 16 heures. Le précipité de N,N'-dicyclohexylurée formé est éliminé par filtration puis lavé à l'éther. Les solutions sont concentrées et l'aldéhyde est purifié par formation du dérivé bisulfite. On obtient 1,322 g de stéaraldéhyde soit environ 5 mM. Le rendement est de 50 %.

C - Synthèse malonique (140). 1,322 g de stéaraldéhyde (5 mM) sont traités par 523 mg d'acide malonique (5 mM) en présence de 3 ml de pyridine anhydre et de deux gouttes de pipéridine, pendant 40 heures à 50° et à l'obscurité. Le milieu est alors acidifié par H_2SO_4 à 50 % et le produit de la réaction est extrait à l'éther. L'éther est lavé par HCl N, par H_2O puis séché sur Na_2SO_4 . On obtient 1,308 g d'acide 2-trans-eicosénoïque (4,25 mM). Le rendement est de 85 %.

L'acide obtenu est estérifié par le diazométhane et l'ester méthylique est étudié par la chromatographie en phase vapeur sur colonne de silicone SE 30 à 200° . Il est accompagné d'une quantité non négligeable d'eicosanoate de méthyle. Par chromatographie préparative sur colonne d'Apiezon L à 270° , on obtient 53 % d'une substance qui se révèle alors homogène. Une dernière purification est réalisée par chromatographie sur colonne d'acide silicique et élution par hexane-benzène (1:1).

$\text{C}_{21}\text{H}_{40}\text{O}_2$	trouvé %	C 77,31	H 12,30	$\text{O}(\text{CH}_3)$ 4,30
	calculé %	C 77,72	H 12,42	$\text{O}(\text{CH}_3)$ 4,63

3/ Synthèse du 3-hydroxyeicosanoate de méthyle (148).

Le zinc est purifié extemporanément par chauffage à 100° pendant 15 minutes avec de l'acide sulfurique concentré contenant quelques gouttes d'acide nitrique. Il est ensuite lavé à l'eau, à l'alcool, à l'acétone, à l'éther, puis séché sous vide.

Le benzène est distillé et séché sur sodium.

A - 3-hydroxyeicosanoate d'éthyle. Dans un ballon rodé sur lequel s'adapte un réfrigérant, on dissout 5 g d'aldéhyde stéarique (18,6 mM) dans 40 ml de benzène anhydre. On ajoute 4 g de zinc et 5 g de bromacétate d'éthyle et on soumet le mélange à une agitation magnétique vigoureuse à 90° pendant 5 jours. Le milieu réactionnel est additionné de 50 ml de H_2SO_4 à 10 %. La phase benzénique décantée est lavée à l'eau puis séchée sur Na_2SO_4 . Après évaporation du benzène, le résidu est chromatographié sur acide silicique Mallinckrodt.

Chromatographie n° 3

Acide silicique 100 g
Célite 50 g
Elution par fractions de 200 ml

Fraction	Solvant	Poids (mg)
1	Hexane-benzène (1:1)	14
2	"	1076
3	"	136
4	"	60
5	Benzène	64
6	"	163
7	"	258
8	"	218
9	"	149
10	"	136
11	"	291
12	Benzène-éther (9:1)	777
13	"	339
14	"	800
15	"	332
16	Benzène-éther (1:1)	660
17	"	46
18	"	32
19	"	8
Total		5559

Des chromatographies en couches minces dans le solvant hexane-éther (60:40) montrent que les fractions 12 à 16 (2.908 mg) sont identiques et homogènes. Il s'agit du 3-hydroxyeicosanoate d'éthyle. Le rendement est de 43 %.

B - Acide 3-hydroxyeicosanoïque. 2,214 g d'ester éthylique (6,2 mM) dissous dans 15 ml de benzène sont saponifiés sous reflux pendant une heure par 20 ml d'une solution méthanolique de potasse à 5 %. Après évaporation des solvants et acidification par HCl 6 N, le résidu est extrait à l'éther qui est ensuite séché sur Na₂SO₄ puis distillé. L'acide 3-hydroxyeicosanoïque est reprécipité dans l'acétate d'éthyle. F. 91-92°. Poids obtenu 958 mg, rendement 47 %.

C - 3-hydroxyeicosanoate de méthyle. 48 mg d'acide β-hydroxyeicosanoïque, dissous dans 0,1 ml de benzène, sont estérifiés par le diazométhane gazeux. L'ester méthylique est purifié par chromatographie préparative en couches minces dans le solvant hexane-éther (60:40). Les plaques sont révélés dans une enceinte saturée de vapeurs d'iode. On prélève le gel de silice renfermant la tache de R_f 0,45 et le produit correspondant est élué par le mélange benzène-éther anhydre (1:1). La substance obtenue est reprécipitée dans l'hexane.

C ₂₁ H ₄₂ O ₃	trouvé %	C 73,71	H 12,29
	calculé %	C 73,63	H 12,36

4/ Synthèse du N-(3-hydroxyeicosanoyl)-alaninate d'éthyle (153, 154).

Dans un ballon rodé on introduit 499 mg d'acide 3-hydroxyeicosanoïque (1,6 mM), 340 mg de dicyclohexylcarbodiimide et 250 mg de l'ester éthylique du chlorhydrate d'alanine en solution dans 4 ml de chloroforme séché sur Na₂CO₃. On ajoute 0,5 ml de triéthylamine distillée et on laisse sous agitation magnétique à température ambiante pendant 16 heures. La réaction est arrêtée par addition de quelques gouttes d'acide acétique. Le précipité de dicyclohexylurée séparé par filtration est lavé par le chloroforme. Le filtrat est lavé par HCl à 10 %, par NaHCO₃ à 5 %, enfin par l'eau jusqu'à neutralité. Il est séché sur Na₂SO₄ puis concentré. Le produit obtenu (598 mg) est purifié par chromatographie.

Chromatographie n° 4

Acide silicique 12 g

Célite 6 g

Elution par fractions de 50 ml

Fraction	Solvant	Poids (mg)
1	Benzène	12
2	"	16
3	"	16
4	"	7
5	Benzène-éther (95 : 5)	14
6	"	66
7	"	36
8	"	16
9	Benzène-éther (90 : 10)	29
10	"	116
11	"	87
12	"	55
13	"	17
14	Benzène-éther (80 : 20)	17
15	"	15
16	Benzène-éther (50 : 50)	8
17	"	12
18	Ether	14
Total		553

Le N-(3-hydroxyeicosanoyl)-alaninate d'éthyle (305 mg) est élué par le solvant benzène-éther (90 : 10). Rendement 44 %. Il est reprécipité dans l'hexane. F. 75-77°.

$C_{25}H_{49}NO_4$	trouvé %	C 70,20	H 11,46	N 3,49
	calculé %	C 70,21	H 11,55	N 3,28

5/ Hydrolyse de la peptidolipine NA selon Crombie.

617 mg de peptidolipine NA sont hydrolysés par 3 ml d'HCl concentré en présence de 3 ml de méthanol sous pression à 120°, pendant 16 heures. La partie lipidique (180 mg, 30 % du produit initial) est extraite à l'éther puis estérifiée. L'ester M_{II} est isolé par chromatographie préparative en couches minces de la manière déjà décrite (page 78).

A - Acétylation (156). 0,08 ml d'acide perchlorique à 70°, 5 ml d'acétate d'éthyle et 0,27 ml d'anhydride acétique sont mélangés dans un ballon rodé pendant 30 minutes à température ambiante. Après addition de 1,4 ml d'anhydride acétique, on refroidit le mélange dans un bain de glace pendant 1 heure puis on le laisse revenir à température ambiante. On acétyle parallèlement 10 mg du 3 hydroxyeicosanoate de méthyle et 10 mg de M_{II} par 1 ml de ce réactif, pendant 5 minutes à température ambiante. La réaction est arrêtée par addition de 2 ml d'eau et l'acétate est extrait à l'hexane.

B - Oxydation chromique.

- Synthèse de la 2-nonadécaneone. 7 g de stéarate de baryum (10 mM) et 5 g d'acétate de baryum sont introduits dans un ballon à distiller et chauffés sous un vide de 8 mm. A 180-190° distille un produit que l'on purifie par chromatographie sur alumine d'activité II maintenue à 56°. 300 ml d'hexane éluent 962 mg de 2 nonadécaneone ; F. 54°, le rendement est de 17 %.

$C_{19}H_{38}O$	trouvé %	C 81,13	H 13,42
	calculé %	C 80,78	H 13,56

On oxyde parallèlement 120 mg (0,34 mM) de 3-hydroxyeicosanoate de méthyle et 120 mg de l'ester M_{II} dissous dans 10 ml de benzène anhydre. On ajoute 60 mg d'anhydride chromique dans 8 ml d'acide acétique distillé sur CrO_3 . On laisse sous agitation magnétique à 50° pendant 60 heures

L'excès d'anhydride chromique est détruit par quelques gouttes de méthanol puis la solution est extraite à l'eau et au benzène. La phase organique est saponifiée par une solution méthanolique de potasse à 5 % dans les conditions habituelles. Le produit de la saponification dissous dans le benzène est repris par une solution de soude à 1 %.

La solution alcaline est acidifiée et l'acide stéarique est extrait à l'éther ; la phase benzénique est lavée à l'eau jusqu'à neutralité, séchée sur Na_2SO_4 puis chromatographiée sur alumine d'activité II maintenue à 56° . 20 ml d'hexane éluant 31 mg de 2-nonadécanone (0,11 mM) le rendement est de 32 %.

V - STRUCTURE DE LA PEPTIDOLIPINE NA

1/ Action de l'hydroxylamine (168).

- solution de tripalmitine (0,66 mM) : 53,8 mg sont dissous dans 100 ml de chloroforme.
- solution de peptidolipine NA (2,06 mM) : 39,8 mg sont dissous dans 20 ml de chloroforme .
- solution alcoolique de soude : 5,60 ml d'une solution aqueuse de NaOH à 50 % sont dilués à 100 ml avec de l'éthanol absolu.
- solution alcoolique de chlorhydrate d'hydroxylamine : 2,61 g de chlorhydrate d'hydroxylamine sont dissous à chaud dans 75 ml d'éthanol absolu. On dilue ensuite la solution à 100 ml avec de l'alcool absolu.
- solution alcaline d'hydroxylamine : des volumes égaux de solution alcoolique de soude et de chlorhydrate d'hydroxylamine sont mélangés extemporanément. Le précipité de NaCl est éliminé par centrifugation.
- perchlorate ferrique : 1,12 g de fer pur, en fil, est dissous à chaud dans 81 ml d'acide perchlorique à 70 %. On ajuste à 100 ml avec de l'eau.
- solution alcoolique de perchlorate ferrique : 1 ml de la solution précédente est dilué extemporanément à 100 ml avec de l'éthanol absolu.
- On prélève 0, 1, 2 et 3 ml des solutions chloroformiques de tripalmitine et de peptidolipine NA. On évapore à sec et on reprend par 1 ml de chloroforme et 0,40 ml de solution alcaline d'hydroxylamine. On concentre à 60° sous un courant d'azote. Après addition de 10 ml de solution alcoolique de perchlorate ferrique, on mesure les colorations obtenues au spectrophotomètre à 530 m μ . Le tableau 33 indique les résultats.

Tableau 33

Densités optiques des solutions de tripalmitine et de peptidolipine NA

ml	D. O.	
	Tripalmitine	Peptidolipine NA
0	0	0
1	120	130
2	340	240
3	360	355

2/ Réduction de la peptidolipine NA

96 mg de peptidolipine NA (0,1 mM) séchés sous vide sur P_2O_5 sont dissous dans 10 ml de tétrahydrofuranne anhydre. On ajoute 0,7 ml d'une solution de LiAlH_4 approximativement molaire. Le tétrahydrofuranne anhydre et la solution de LiAlH_4 sont préparés selon la méthode de Crawhall et Elliott (169).

Le mélange maintenu en atmosphère anhydre est agité pendant 3 heures à température ambiante. On détruit l'excès de LiAlH_4 en acidifiant le milieu par addition d'acide chlorhydrique 0,2 N.

Les solvants sont évaporés et le résidu est repris par l'alcool absolu. Le produit obtenu est hydrolysé par 1 ml de HCl 6 N, en tube scellé à 110° pendant 36 heures. L'hydrolysate est neutra-

lisé par la soude décarbonatée puis introduit sur colonne de Dowex 2 (de 20 × 1,5 cm) traitée au préalable par de la soude décarbonatée puis par l'eau exempte de CO₂. L'amino alcool est élué par fractions de 1 ml. On recueille 30 fractions.

- Formation du DNP amino alcool. Une partie de l'éluat est concentrée jusqu'à un volume de 1,5 ml. Le pH est ajusté à 8,5. On ajoute 50 µl de DNFB en solution dans 1 ml d'éthanol.

Le mélange est agité pendant 3 heures. On ajoute 45 mg de glycocolle et l'agitation est maintenue encore deux heures. Après évaporation de l'alcool, le DNP amino alcool est extrait à l'éther.

La phase étherée est lavée par une solution de bicarbonate à 2 %, séchée sur Na₂SO₄ puis concentrée. Le résidu repris par l'alcool à 70° est introduit sur une colonne d'alumine d'activité II (3 × 0,7 cm). Le dinitrophénol se fixe dans la partie supérieure de la colonne. Le DNP amino alcool est élué par l'alcool à 70°.

0,03 µM des différents DNP amino alcools sont chromatographiés en couches minces sur gel de silice.

3/ Saponification ménagée de la peptidolipine NA.

A - Acide peptidolipique. 328 mg de peptidolipine NA sont traités par 17 ml de soude éthanolique 0,1 N à 37° pendant 16 heures. L'alcool est évaporé et le résidu extrait à l'eau et au chloroforme. La phase aqueuse est acidifiée et l'acide peptidolipique (298 mg) extrait au chloroforme.

B - Action de la carboxypeptidase. A 37° et pendant vingt minutes, on fait agir quelques gouttes d'une solution diluée de carboxypeptidase sur 0,4 mg d'acide peptidolipique dissous dans 0,1 ml de chloroforme (le pH est ajusté à 7,8 avec une solution de triméthylamine à 5 %).

La réaction est arrêtée par addition d'acide acétique, on évapore à sec et on identifie la thréonine par chromatographie sur papier dans le solvant VIII.

C - Méthylation de l'acide peptidolipique (175). 198 mg sont dissous dans 65 ml de diméthylformamide. On ajoute 18 ml d'iodure de méthyle et 13,5 g d'oxyde d'argent fraîchement préparé que l'on introduit par petites portions. On agite le mélange à température ambiante pendant 44 heures. On ajoute à nouveau 18 ml d'iodure de méthyle, 13,5 g d'oxyde d'argent, 10 ml de diméthylformamide et on poursuit l'agitation 48 heures. On filtre pour éliminer le précipité d'iodure d'argent que l'on rince plusieurs fois avec le diméthylformamide. Au filtrat, on ajoute une troisième fois iodure de méthyle et oxyde d'argent. Après 72 heures la méthylation est terminée. On filtre et on lave le précipité par le diméthylformamide. Le filtrat est additionné de 350 ml d'une solution de cyanure de potassium à 1 %. On filtre à nouveau et on extrait le filtrat à l'eau et au chloroforme. La phase chloroformique renferme 145 mg d'acide peptidolipique méthylé qui est chromatographié sur acide silicique.

Chromatographie n° 5

Acide silicique 3 g
Célite 1,5 g
Elution par fractions de 25 ml

Fraction	Solvant	Poids (mg)
1	Chloroforme	8
2	"	7
3	"	1
4	"	1
5	"	0
6	Chloroforme-méthanol (98:2)	1
7	"	66
8	"	21
9	Chloroforme-méthanol (95:5)	31
10	"	2
11	"	0
Total		138 mg

La fraction 7 renferme l'acide peptidolipique méthylé $C_{54}H_{99}N_7O_{12}$.

4/ Hydrolyse ménagée de la peptidolipine NA.

- Réaction de Dakin-West sur le peptidolipide Q. 2 mg sont traités par le mélange anhydride acétique-pyridine (3:2) dans les conditions déjà décrites. Le résultat est indiqué dans le tableau 34.

Tableau 34

Analyse quantitative des acides aminés du peptidolipide Q après réaction de Dakin-West

Acide aminé	C _c	μ moles	Proportions molaires
Thréonine	4.440	1,25	1
Alanine	8.190	2,3	2
Valine	4.450	1,25	1
<i>allo</i> -Isoleucine	3.900	1,10	1
Proline	4.085	1,29	1

5/ Oxydation chromique de la peptidolipine NA (72).

- Solution d'anhydride chromique : 55 mg sont dissous dans 1,5 ml d'acide acétique concentré et 0,05 ml de pyridine anhydre.

- 1 mg de peptidolipine NA et 0,8 mg d'étamycine sont traités parallèlement par 0,1 ml de la solution d'oxydant à température ambiante pendant 16 heures. Les produits de la réaction sont repris à l'eau et au chloroforme. Les phases chloroformiques sont concentrées puis hydrolysées par 0,2 ml de HCl 6 N à 110° pendant 40 heures. Les hydrolysats sont concentrés sous vide sur KOH, dessalifiés sur Dowex 2, et analysés par chromatographie sur papier.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Nous avons extrait de *Nocardia asteroides* ATCC 9969 un mélange de peptidolipides qui représentent 5,5 % du poids sec du mycélium.

Les essais de purification par chromatographies sur acide silicique et trisilicate de magnésium ont donné un produit hétérogène.

Nous avons utilisé la distribution à contre courant avec le système de solvants : hexane-tétrachlorure de carbone-méthanol-eau (22:40:38:3) pour isoler la peptidolipine NA, $C_{50}H_{89}N_7O_{11}$, F. 232-233°, $[\alpha]_D = +42,7^\circ$, P.M. 963, dont nous avons démontré la structure.

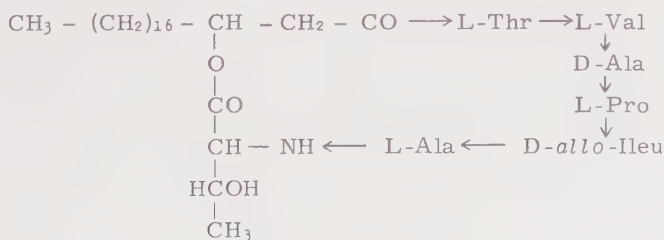
L'étude quantitative et microbiologique de la partie peptidique indique la présence de sept moles d'acides aminés : D-Ala₁, L-Ala₁, D-*allo*-Ileu₁, L-Pro₁, L-Thr₂, L-Val₁. Une hydrolyse acide partielle libère la thréonine et un hexapeptide. L'acide aminé N-terminal (L-Thr) a été recherché par la méthode de Sanger, l'acide aminé C-terminal (L-Ala) par la réaction de Dakin-West et l'enchaînement des aminoacides par l'étude des deux tripeptides : L-Thr - L-Val - D-Ala et L-Pro - D-*allo*-Ileu - L-Ala, provenant d'une hydrolyse acide ménagée de l'hexapeptide. La configuration optique des acides aminés a été vérifiée par action de la D-aminoacide oxydase. La méthode d'Edman confirme la séquence de l'hexapeptide :



Une hydrolyse acide énergique de la peptidolipine NA libère un mélange d'acides 2-*trans*-eicosénoïque et 3-hydroxyeicosanoïque qui sont identiques aux acides de synthèse correspondants. Nous avons démontré que l'acide éthylénique était formé à partir de l'acide hydroxylé par β élimination d'une molécule d'eau au cours de l'hydrolyse. Afin de limiter la déshydratation nous avons mis au point les conditions opératoires sur le N-(3-hydroxyeicosanoyl)-alaninate d'éthyle synthétique

L'hydroxyacide naturel étant lévogyre, la partie lipidique de la peptidolipine NA est l'acide D(-) 3-hydroxyeicosanoïque. Cet acide amidifie une molécule de thréonine.

L'absence de groupements -COOH et -NH₂ libres et les bandes d'absorption de la fonction ester dans le spectre infrarouge, nous ont fait envisager une structure cyclique lactonique pour la peptidolipine NA. Soumise à une saponification ménagée elle se transforme en un produit acide, l'acide peptidolipique, ayant une molécule de thréonine C-terminale. La réduction de la peptidolipine NA par LiAlH₄ et l'obtention du thréoninol confirment la présence d'une lactone dans laquelle la thréonine est engagée par son carboxyle. Pour déterminer l'hydroxyle estérifié nous avons soumis la peptidolipine NA à une oxydation chromique qui détruit les hydroxyaminoacides dont l'hydroxyle est libre. Les deux molécules de thréonine disparaissent. Par suite la liaison ester a lieu avec l'hydroxyle de l'acide 3-hydroxyeicosanoïque et la peptidolipine NA à la structure suivante :



Cette formule ainsi que celles des dérivés méthyliques de la peptidolipine NA et de l'acide peptidolipique ont été vérifiées par spectrométrie de masse. Dans le cas de la peptidolipine NA on observe des pics correspondants à l'élimination des groupements CH_3CHO des deux molécules de thréonine et à la séparation de chacun des radicaux d'acides aminés de la séquence peptidique. Nous avons ici une méthode intéressante de détermination d'un enchaînement peptidique par spectrométrie de masse d'un polypeptide N-acylé, méthode qui a été utilisée également avec la fortuitine (23).

La structure de la peptidolipine NA est celle d'un depsipeptide ; elle présente des analogies avec l'espérine et l'isariine. La présence de l'acide D(-)3-hydroxyeicosanoïque est à souligner : ce composé n'avait jamais été isolé des produits naturels alors que les 3-hydroxyacides de C_4 à C_{18} ont déjà été décrits. Certains d'entre eux entrent dans la composition de lipopeptides tels que la viscosine, le serratamolide ou l'isariine.

Parmi les acides aminés de la peptidolipine NA, la L-thréonine, la L-valine et la D-alanine se rencontrent fréquemment dans les antibiotiques ; au contraire la D-*allo*-isoleucine est très rare.

L'activité antibiotique de la peptidolipine NA a été examinée *in vitro* sur plusieurs organismes gram + et gram - à la concentration de 100 $\mu\text{g/ml}$. Elle possède une activité antibactérienne contre *Streptococcus pyogenes* A 38 et *Salmonella Schottmuelleri*, tandis qu'aucune action n'a été constatée contre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* 2.977, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Entamoeba histolytica* et *Trichomonas foetus*.

Un spectre antibactérien aussi limité ne permet pas de classer la peptidolipine NA parmi les antibiotiques malgré des analogies structurales évidentes avec certains d'entre eux. Différentes hypothèses ont été suggérées quant aux relations entre la structure et l'activité bactériostatique. D'après Vogler et coll. (189) la présence d'acides aminés basiques serait nécessaire. Des peptides synthétiques N-acylés sur le groupement $-\text{NH}_2$ terminal et renfermant la lysine se sont révélés particulièrement actifs. En accord avec ce résultat, plusieurs antibiotiques naturels possèdent des groupements $-\text{NH}_2$ libres appartenant par exemple à l'acide diaminobutyrique. Peut-être y a-t-il une relation entre l'absence de ces groupements basiques et la faible activité de la peptidolipine NA. Par contre un facteur favorable serait, selon Vogler, la protection du $-\text{COOH}$ terminal par une fonction amide ou ester que l'on retrouve dans la peptidolipine.

Nous avons recherché des substances analogues dans d'autres souches de *Nocardia* : *Nocardia asteroides* ATCC 443 et ATCC 535, *Nocardia brasiliensis* ATCC 426 et ATCC 733. Les essais ont été négatifs. Ce résultat a été observé dans d'autres cas : certains microorganismes produisent un antibiotique alors que des souches voisines n'en synthétisent pas.

Les raisons de cette différence sont encore assez mystérieuses. On a vu dans la formation des antibiotiques tantôt un processus d'élimination des D-aminoacides inutiles, tantôt une voie métabolique primitive abandonnée ensuite au cours de l'évolution. Quelle que soit l'explication avancée il reste que le processus de biogénèse des antibiotiques polypeptidiques est certainement assez complexe (190). En effet on trouve dans ces derniers plus de soixante aminoacides différents et le code ternaire qui dirige la synthèse protéique est ici insuffisant. Il est certain que les recherches dans ce domaine sont riches de promesses.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - Bergey's Manual of Determinative Bacteriology - Williams and Wilkins, Baltimore 1948.
- 2 - F. MARIAT - Arch. Inst. Past. Tunis 39 1962 309.
- 3 - J.E. PHILIP, J.R. SCHENCK, M.P. HARGIE - Antibiotics Annual 1956-57 699.
- 4 - C.H. WALLAS, J.L. STROMINGER - J. Biol. Chem. 238 1963 2264.
- 5 - E.A. JOHNSON, K.L. BURDON - J. Bacteriol. 54 1947 281.
- 6 - W.D. CELMER, I.A. SOLOMONS - J. Am. Chem. Soc. 75 1953 1372.
- 7 - S. NAKAMURA, H. UMEZAWA - J. Antibiotics (Japan) 84 1955 66.
- 8 - D.A. HARRIS, H.B. WOODRUFF - Antibiotics Annual 1953-54 609.
- 9 - R.A. GRAY - Phytopathology 45 1955 281.
- 10 - A. STOLL, J. RENZ, A. BRACK - Helv. Chim. Acta 34 1951 862.
- 11 - W. KELLER SCHIERLEIN, V. PRELOG - Helv. Chim. Acta 44 1961 1981.
- 12 - J. FREUND, M.M. LIPTON - Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 68 1948 373.
J. FREUND - Adv. Tuberc. Res. 7 1956 130.
- 13 - G. MICHEL - Thèse de Doctorat Paris 1958.
- 14 - C. BORDET, G. MICHEL - Biochim. Biophys. Acta 70 1963 613.
- 15 - C. BORDET, G. MICHEL - Bull. Soc. Chim. Biol. 46 1964 1101.
- 16 - G. MICHEL, C. BORDET, E. LEDERER - Compt. Rend. Acad. Sci. 250 1960 3518.
- 17 - C. BORDET, A.H. ETEMADI, G. MICHEL, E. LEDERER - Bull. Soc. Chim. 1965 234.
- 18 - G. MICHEL, E. LEDERER - Bull. Soc. Chim. 1962 651.
- 19 - M. GUINAND, G. MICHEL, E. LEDERER - Compt. Rend. Acad. Sci. 246 1958 848.
- 20 - M. GUINAND, G. MICHEL - Compt. Rend. Acad. Sci. 256 1963 1621.
- 21 - M. GUINAND, G. MICHEL, E. LEDERER - Compt. Rend. Acad. Sci. 259 1964 1267.
- 22 - K. TOKI, T. OHNO - J. Agr. Chem. Soc. Japan 29 1955 370.
- 23 - E. VILKAS, A.M. MIQUEL, E. LEDERER - Biochim. Biophys. Acta 70 1963 217.
- M. BARBER, P. JOLLES, E. VILKAS, E. LEDERER - Biochem. Biophys. Res. Comm. 18 1965 469.
- 24 - H. KOFFLER - Science 130 1959 1419.
- 25 - G.C. AINSWORTH, A.M. BROWN, G. BROWNLIE - Nature 160 1947 263.
- 26 - W. HAUSMANN, L.C. CRAIG - J. Am. Chem. Soc. 76 1954 4892.
- 27 - W. HAUSMANN - J. Am. Chem. Soc. 78 1956 3663.
- 28 - G. BISERTE, M. DAUTREVAUX - Bull. Soc. Chim. Biol. 39 1957 795.
- 29 - K. VOGLER, P. LANZ - Helv. Chim. Acta 43 1960 270, 279, 574.
- 30 - K. VOGLER, R.O. STUDER, P. LANZ, W. LERGIER, E. BOHNI - Experientia 17 1961 223.

- 31 - T. SUZUKI, K. HAYASHI, K. FUJIKAWA, K. TSUKAMOTO - J. Biochem. (Japan) 54 1963 555
- 32 - K. VOGLER, R.O. STUDER, P. LANZ, W. LERGIER, E. BÖHNI - Experientia 20 1964 365.
- 33 - S. WILKINSON - Lancet April 27 1963 922.
- 34 - Y. KOYAMA, A. KUROSAWA, A. TSUCHIYA, K. TAKAKUTA - J. Antibiotics (Japan) 3 1950 57.
- 35 - M. DAUTREVAUX, G. BISERTE - Bull. Soc. Chim. Biol. 43 1961 495.
- 36 - J.W. HALL - Am. J. Med. Sci. 240 1960 561.
- 37 - M. Mc MILLAN, T.M.L. PRICE, D.M. Mac LAREN, G.W. SCOTT - Lancet, October 13, 1962 737.
- 38 - M.M. SHEMAKIN - Angew. Chem. 72 1960 342.
- 39 - D.W. RUSSEL, M.E. BROWN - Biochim. Biophys. Acta 38 1960 382.
- 40 - PL. A. PLATTNER, U. NAGER - Experientia 3 1947 325.
- 41 - PL. A. PLATTNER, U. NAGER - Helv. Chim. Acta 31 1948 2192.
- 42 - PL. A. PLATTNER, U. NAGER - Helv. Chim. Acta 31 1948 665.
- 43 - M.M. SHEMAKIN, Y.A. OVCHINNIKOV, A.A. KIRYUSHKIN, V.T. IVANOV - Tetrahedron Letters 1962 301.
- 44 - PL. A. PLATTNER, K. VOGLER, R.O. STUDER, P. QUITT - Helv. Chim. Acta 46 1963 927.
- 45 - M.M. SHEMAKIN, Y.A. OVCHINNIKOV, A.A. KIRYUSHKIN, V.T. IVANOV - Tetrahedron Letters 1963 885.
- 46 - P. QUITT, R.O. STUDER, K. VOGLER - Helv. Chim. Acta 46 1963 1715.
- 47 - H. BROCKMANN, H. GEEREN - Ann. 603 1957 213.
- 48 - M.M. SHEMAKIN, E.I. VINOGRADOVA, M.Y. FEIGINA, N.A. ALDANOVA - Tetrahedron Letters 1963 351.
- 49 - M.M. SHEMAKIN, N. A. ALDANOVA, E.I. VINOGRADOVA, M.Y. FEIGINA - Tetrahedron Letters 1963 1921.
- 50 - L. VINING, W. TABER - Canad. J. Chem. 35 1957 1109.
- 51 - H.H. WASSERMAN, J.J. KEGGI, J.E. Mc KEON - J. Am. Chem. Soc 83 1961 4107.
- 52 - N.J. CARTWRIGHT - Biochem. J. 67 1957 663.
- 53 - D.W. RUSSEL - Biochim. Biophys. Acta 45 1960 411.
- 54 - D.W. RUSSEL - J. Chem. Soc. 1962 753.
- 55 - M.M. SHEMAKIN, Y.A. OVCHINNIKOV, V.T. IVANOV, A.A. KIRYUSHKIN - Tetrahedron 19 1963 995.
- 56 - M.M. SHEMAKIN, Y.A. OVCHINNIKOV, V.T. IVANOV, A.A. KIRYUSHKIN - Tetrahedron Letters 1963 1927.
- 57 - T. ITO, H. OGAWA - Bull. Agr. Chem. Soc. (Japan) 23 1959 536.
- 58 - L.C. VINING, W.A. TABER - Canad. J. Chem. 40 1962 1579.
- 59 - E. KATZ, L.H. PUGH - App. Microbiol. 9 1961 263.
- 60 - S.A. WAKSMAN, H.B. WOODRUFF - Proc. Soc. Exp. Biol. 45 1940 609.
- 61 - H. BROCKMANN - Angew. Chem. 72 1960 939.
- 62 - H. BROCKMANN - Fortschr. Chem. Org. Naturst. 18 1960.
- 63 - G. SCHMIDT-KASTNER - Naturwiss. 43 1956 131.
- 64 - H. BROCKMANN, G. BOHNSACK, B. FRANCK, H. GRÖNE, H. MUXFELDT, G. SULING - Angew. Chem 68 1956 70.
- 65 - H. BROCKMANN, P. BOLDT - Naturwiss. 50 1963 19.
- 66 - A. BUTENANDT, U. SCHIEDT, E. BIEKERT, R.J.T. CROMARTIE - Ann. 590 1954 75

- 67 - J. GRIPENBERG - Acta. Chem. Scand. 12 1958 603.
- 68 - E. KATZ - N.Y. Acad. Sci - Conference on Actinomycins 1960.
- 69 - H. BROCKMANN, W. SUNDERKOTTER, K.W. OHLY, P. BOLDT - Naturwiss. 47 1960 230.
- 70 - B. HEINEMANN, A. GOUREVITCH, J. LEIN, D.L. JOHNSON, M.A. KAPLAN, D. VANAS, I.R. HOOPER - Antibiotics Annual 1954-55 728.
- 71 - Q.R. BARTZ, J. STANDIFORD, J.D. MOLD, D.W. JOHANNESSEN, A. RYDER, A. MARETZKI, T.H. HASKELL - Antibiotics Annual 1954-55 777.
- 72 - J.C. SHEEHAN, H.G. ZACHAU, W.B. LAWSON - J. Am. Chem. Soc. 80 1958 3349.
- 73 - F.W. EASTWOOD, B.K. SNELL, A. TODD - J. Chem. Soc. 1960 2286.
- 74 - H. VANDERHAEGHE, G. PARMENTIER - J. Am. Chem. Soc. 82 1960 4414.
- 75 - J.C. SHEEHAN, P.E. DRUMMOND, J.N. GARDNER, K. MAEDA, D. MANIA, S. NAKAMURA, A.K. SEN, J.A. STOCK - J. Am. Chem. Soc. 85 1963 2867.
- 76 - J.C. SHEEHAN, K. MAEDA, A.K. SEN, J.A. STOCK - J. Am. Chem. Soc. 84 1962 1303.
- 77 - R.J. ANDERSON - Fortschr. Chem. Org. Naturst. 3 1939 145 ; Chem. Rev. 29 1941 225.
- 78 - A. AEBI, J. ASSELINEAU, E. LEDERER - Bull. Soc. Chim. Biol. 35 1953 661.
- 79 - C.H. LEA, D.N. RHODES - Biochem. J. 54 1953 467.
- 80 - E. VILKAS, E. LEDERER - Compt. Rend. Acad. Sci. 240 1955 1156.
G. MICHEL, E. LEDERER - Compt. Rend. Acad. Sci. 240 1955 2454.
- 81 - G. DENIGES - Compt. Rend. Acad. Sci. 148 1909 172, 182 et 422.
- 82 - H.T. GORDON, W. THORNBURG, L.N. WERUM - Anal. Chem. 28 1956 849.
- 83 - P. FLEURY, J.E. COURTOIS, P. MALANGEAU - Bull. Soc. Chim. Biol. 35 1953 537.
- 84 - F. FEIGL - Spot Tests Elsevier 1954 Vol. II p. 285.
- 85 - A.P. MAC LENNAN, D.W. SMITH, H.M. RANDALL - Biochem. J. 74 1960 3P.
- 86 - M. WOLFE - Biochim. Biophys. Acta 23 1957 186.
- 87 - E. Mac FARREN - Anal. Chem. 23 1951 168.
- 88 - E. WORK - Biochim. Biophys. Acta 3 1949 400.
- 89 - D.O. GRAY, J. BLAKE, D.H. BROWN, L. FOWDEN - J. Chromatog. 13 1964 276.
- 90 - J.A. CIFONELLI, F. SMITH - Anal. Chem. 26 1954 1132.
- 91 - R. ACHER, C. FROMAGEOT, M. JUTISZ - Biochim. Biophys. Acta 5 1950 81.
R. ACHER, C. FROMAGEOT, M. JUTISZ - Biochim. Biophys. Acta 8 1952 442.
- 92 - C.E. DENT - Biochem. J. 43 1948 169.
- 93 - R. ACHER, C. CROKER - Biochim. Biophys. Acta 9 1952 704.
- 94 - T.L. HARDY, D.O. HOLLAND, J.H.C. NAYLER - Anal. Chem. 27 1955 971.
- 95 - A. POLSON - Nature 161 1948 351.
- 96 - Y. KOBAYASHI, K. URAGUCHI, T. TATSUNO, F. SAKAI, M. TSUKIOKA, Y. SAKAI, O. YONEMITSU, T. SATO, M. MIYAKE, M. SAITO, M. ENOMOTO, T. SHIKATA, T. ISHIKO - Proc. Japan Acad. 34 1958 736.
- 97 - S. MARUMO - Bull. Agr. Chem. Soc. (Japan) 23 1959 428.
- 98 - A.L. LEVY, I.I. GESCHWIND, C.H. LI - J. Biol. Chem. 213 1955 187.
- 99 - F. SANGER - Biochem. J. 39 1945 507.
- 100 - A.L. LEVY - Nature 174 1954 126.
- 101 - W.H. STEIN, S. MOORE - J. Biol. Chem. 192 1951 663.
- 102 - S. MOORE, W.H. STEIN - J. Biol. Chem. 211 1954 893 et 907.

- 103 - F.P. CHINARD - J. Biol. Chem. 199 1952 91.
- 104 - G. BARGER - Ber. 37 1904 1754.
- 105 - K. RAST - Ber. 54 1921 1979.
- 106 - M. IKAWA, E.E. SNELL, E. LEDERER - Nature 188 1960 558.
- 107 - M. IKAWA, E.E. SNELL - Biochim. Biophys. Acta 60 1962 186.
- 108 - W.A. WOOD, I.C. GUNSALUS - J. Biol. Chem. 190 1951 403.
- 109 - H. PELZER - Biochim. Biophys. Acta 63 1962 229.
- 110 - P. JOLLES, H. NGUYEN-CROS, E. LEDERER - Biochim. Biophys. Acta 43 1960 559.
- 111 - M. CHAPUT, G. MICHEL, E. LEDERER - Biochim. Biophys. Acta 63 1962 310.
- 112 - M. CHAPUT, G. MICHEL, E. LEDERER - Biochim. Biophys. Acta 78 1963 329.
- 113 - J.J. ARMSTRONG, J. BADDILLEY, J.G. BUCHANAN, A.L. DAVISON, M.V. KELEMEN, F.C. NEUHAUS - Nature 184 1959 247.
- 114 - D.H. SPACKMAN, W.H. STEIN, S. MOORE - Anal. Chem. 30 1958 1190.
- 115 - P. VON TAVEL, R. SIGNER - Advances in Protein Chemistry XI 1956 237.
- 116 - W. STAMM - in Biochemisches Taschenbuch Springer Verlag 1956 p. 1146.
- 117 - E. WIEDEMANN - Helv. Chim. Acta 30 1947 892.
- 118 - C.H.W. HIRS, S. MOORE, W.H. STEIN - J. Biol. Chem. 219 1956 623.
- 119 - A. DREZE, A. de BOECK - Arch. Intern. Physiol. 60 1952 201.
- 120 - J. JOLLES-THAUREAUX - Thèse de Doctorat Paris 1957.
- 121 - A. POLSON, V.M. MOSLEY, R.W.G. WYCKOFF - Science 105 1948 603.
- 122 - G. BISERTE, J.W. HOLLEMAN, J. HOLLEMAN-DEHOVE, P. SAUTIERE - J. Chromatog. 2 1959 225.
- 123 - G. BISERTE, R. OSTEUX - Bull. Soc. Chim. Biol. 33 1951 50.
- 124 - E.O.P. THOMPSON, A.R. THOMPSON - Progrès dans la chimie des Substances Organiques Naturelles, Vol. 12 1955 270.
- 125 - H. NEURATH, G.W. SCHWERT - Chem. Rev. 46 1950 69.
- 126 - H.D. DAKIN, R. WEST - J. Biol. Chem. 78 1928 91, 745.
- 127 - R.A. TURNER, G. SCHMERZLER - J. Am. Chem. Soc. 76 1954 949.
- 128 - R.G. SHEPHERD, S.D. WILLSON, K.S. HOWARD, P.H. BELL, D.S. DAVIES, S.B. DAVIS, E.A. EIGNER, N.E. SHAKESPEARE - J. Am. Chem. Soc. 78 1956 5067.
- 129 - SCHIN-ICHI ISHII, B. WITKOP - J. Am. Chem. Soc. 85 1963 1832.
- 130 - P. EDMAN - Acta Chem. Scand. 4 1950 277, 283.
- 131 - H. FRAENKEL-CONRAT - Methods of Biochemical Analysis 2 1955 383.
- 132 - E. CHERBULIEZ, B. BAEHLER, J. RABINOWITZ - Helv. Chim. Acta 43 1960 1871.
- 133 - H. SCHLENK, J.L. GELLERMAN - Anal. Chem. 32 1960 1412.
- 134 - G. DIJKSTRA - Nature 192 1961 965.
- 135 - HUANG MINLON - J. Am. Chem. Soc. 68 1946 2487.
- 136 - F. AYLWARD, M. SAWISTOWSKA - Chem. and Ind. 1961 404.
- 137 - E. VON RUDLOFF - Canad. J. Chem. 34 1956 1413.
- 138 - T. CHANG, C.C. SWEETLEY - J. Lipid. Research 3 1962 170.
- 139 - J.W. FARQUHAR, W. INSULL, P. ROSEN, W. STOFFEL, E.H. AHRENS - Nutrition Revs. 17 1959 I.
- 140 - E.F. JENNY, C.A. GROB - Helv. Chim. Acta 36 1953 1936.
- 141 - P.E. VERKADE - Rec. Trav. Chim. 62 1943 393.

- 142 - Organic Syntheses Collective Vol. I J. WILEY ed. 1932 p. 142.
- 143 - K.W. ROSENMUND - Ber. 51 1918 585.
- 144 - E. MOSETTIG - Organic Reactions Vol IV 1948 362.
- 145 - R. FEULGEN, M. BEHRENS - Z. Physiol. Chem. 177 1928 221.
- 146 - C.A. GROB, E.F. JENNY, H. UTZINGER - Helv. Chim. Acta 34 1951 2249.
- 147 - K.E. PFITZNER, J.G. MOFFATT - J. Am. Chem. Soc. 85 1963 3027.
- 148 - R.L. SHRINER - Organic Reactions Vol. I 1942 1.
- 149 - L.F. ENG, Y.L. LEE, R.B. HAYMAN, B. GERSTL - J. Lipid Research 5 1964 128.
- 150 - A.P. TULLOCH, J.F.T. SPENCER - Canad. J. Chem. 42 1964 830.
- 151 - D.G. BISHOP, J.L. STILL - J. Lipid. Research 4 1963 81.
- 152 - J.S. O'BRIEN, G. ROUSER - Anal. Biochem. 7 1964 288.
- 153 - J.C. SHEEHAN, G.P. HESS - J. Am. Chem. Soc. 77 1955 1067.
- 154 - I. PHOTAKI - J. Am. Chem. Soc. 85 1963 1123.
- 155 - L. CROMBIE - J. Chem. Soc. 1955 999.
- 156 - J.S. FRITZ, G.H. SCHENK - Anal. Chem. 31 1959 1808.
- 157 - I. KITAGAWA, M. SUGAI, F.A. KUMMEROW - J. Am. oil Chemists' Soc. 39 1962 217.
- 158 - F. KRAFFT - Ber. 12 1879 1664.
- 159 - K. SERCK-HANSEN - Ark. Kemi 10 1956 135.
- 160 - J. ASSELINEAU - Les lipides bactériens, Hermann, Paris, 1962.
- 161 - R.U. LEMIEUX - Canad. J. Chem. 29 1951 415.
- 162 - S. BERGSTRÖM, H. THEORELL, H. DAVIDE - Arch. Biochem. 10 1946 165.
- 163 - F.G. JARVIS, M.J. JOHNSON - J. Am. Chem. Soc. 71 1949 4124.
- 164 - M. IKAWA, J.B. KOEPFLI, S.G. MUDD, C. NIEMANN - J. Am. Chem. Soc. 75 1953 1035.
- 165 - A.J. BURTON - Dissertation Abstracts 22 1961 1383.
- 166 - M.G. MACFARLANE - Nature 196 1962 136.
- 167 - M.M. RAPPORT, N. ALONZO - J. Biol. Chem. 217 1955 183.
- 168 - W.D. SKIDMORE, C. ENTENMAN - J. Lipid. Research 3 1962 356.
- 169 - J.C. CRAWHALL, D.F. ELLIOTT - Biochem. J. 61 1955 264.
- 170 - A.C. CHIBNALL, M.W. REES - Biochem. J. 68 1958 105.
- 171 - M. JUTISZ dans Chromatographie en Chimie Organique et Biologique sous la direction de E. LEDERER, Masson, Paris Vol III, 1960 277.
- 172 - W. GRASSMANN, H. HÖRMANN, H. ENDERS - Z. Physiol. Chem. 296 1954 208.
- 173 - W. GRASSMANN, H. HÖRMANN, H. ENDERS - Chem. Ber. 88 1955 102.
- 174 - H. JATZKEWITZ, N.D. TAM - Z. Physiol. Chem. 296 1954 188.
- 175 - R. KUHN, H. TRISCHMANN et I. LOW - Angew. Chem. 67 1955 32.
- 176 - C.S. HUDSON - J. Am. Chem. Soc. 32 1910 338, 61 1939 1525.
- 177 - B. WITKOP, C.M. FOITZ - J. Am. Chem. Soc. 79 1957 192.
- 178 - B. WITKOP - Experientia 12 1956 372.
- 179 - P. DESNUELLE, A. CASAL - Biochim. Biophys. Acta 2 1948 64.
- 180 - L. JOSEFSSON, P. EDMAN - Biochim. Biophys. Acta 25 1957 614.
- 181 - L. JOSEFSSON, P. EDMAN - Ark. Kemi 12 1958 183.
- 182 - K. NARITA - J. Am. Chem. Soc. 81 1959 1751.

- 183 - S. SAKAKIBARA, K.H. SHIN, G.P. HESS - J. Am. Chem. Soc. 84 1962 4921.
- 184 - L. JOSEFSSON - Biochim. Biophys. Acta 74 1963 774.
- 185 - T.B. MOORE, C.G. BAKER - J. Chromatog. 1 1958 513.
- 186 - J.B. JEPSON, I. SMITH - Nature 172 1953 1100.
- 187 - M. BARBER, W.A. WOLSTENHOLME, M. GUINAND, G. MICHEL, E. LEDERER - Tetrahedron Letters, 1965, sous presse.
- 188 - F. SANGER, E.O.P. THOMPSON - Biochem. J. 53 1953 353.
- 189 - K. VOGLER, P. LANZ, P. QUITT, R.O. STUDER, W. LERGIER, E. BOHNI, B. FUST - Helv. Chim. Acta 47 1964 526.
- 190 - M. BODANSZKY, D. PERLMAN - Nature 28 1964 840.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION	7
 CHAPITRE I - ANTIBIOTIQUES PEPTIDIQUES	
I - Peptidolipides	9
1/ Peptidolipides à cycle peptidique	10
2/ Depsipeptides	12
II - Peptides à structure cyclique lactonique	15
1/ Actinomycines	16
2/ Etamycine	16
3/ Staphylomycine S et Ostréogrycine B	18
4/ Télomycine	19
 CHAPITRE II - ISOLEMENT ET PURIFICATION DE LA PEPTIDOLIPINE NA	
I - Isolement des peptidolipides	21
II - Analyse des peptidolipides	22
1/ Composition	22
2/ Etude qualitative des acides aminés	22
3/ Etude quantitative des acides aminés	25
III - Etude chromatographique des peptidolipides	25
1/ Chromatographie sur trisilicate de magnésium	26
2/ Autres chromatographies	27
IV - Purification de la peptidolipine NA par contre courant	27
1/ Recherche des conditions optimales	27
2/ Fractionnement des peptidolipides par contre courant	29
3/ Caractéristiques de la peptidolipine NA	32
 CHAPITRE III - ETUDE DE LA FRACTION PEPTIDIQUE	
I - Détermination de la formule brute	35
II - Détermination de la séquence peptidique	36
1/ Isolement de peptides	36
2/ Etude du peptide P	37
3/ Etude du peptide Q	44

CHAPITRE IV - ETUDE DE LA FRACTION LIPIDIQUE

I - Isolement, étude et synthèse du 2- <i>trans</i> -eicosénoate de méthyle	45
1/ Isolement	45
2/ Etude	46
3/ Synthèse du 2- <i>trans</i> -eicosénoate de méthyle	48
II - Synthèse, isolement et étude du 3-hydroxyeicosanoate de méthyle	50
1/ Synthèse du 3-hydroxyeicosanoate de méthyle	50
2/ Isolement du 3-hydroxyeicosanoate de méthyle	51
3/ Etude du 3-hydroxyeicosanoate de méthyle	52

CHAPITRE V - STRUCTURE DE LA PEPTIDOLIPINE NA

I - Structure cyclique lactonique	57
1/ Liaison acide gras-peptide	57
2/ Action de l'hydroxylamine	58
3/ Réduction de la peptidolipine NA par LiAlH ₄	58
4/ Saponification ménagée de la peptidolipine NA - Acide peptidolipique	59
5/ Hydrolyse ménagée de la peptidolipine NA - Peptidolipide Q	61
II - Structure complète de la peptidolipine NA	63
1/ Position de l'hydroxyle estérifié	63
2/ Spectrométrie de masse de la peptidolipine NA et de son éther diméthylque	64

CHAPITRE VI - DESCRIPTION DES EXPERIENCES

I - Techniques générales	67
1/ Séparations chromatographiques	67
2/ Séparations par contre courant	68
3/ Techniques analytiques	68
II - Fractionnement des peptidolipides	68
1/ Chromatographie sur acide silicique Mallinckrodt	68
2/ Chromatographie sur trisilicate de magnésium	71
3/ Distribution à contre courant	73
III - Etude de la fraction peptidique de la peptidolipine NA	74
1/ Analyse quantitative des acides aminés	74
2/ Hydrolyse acide partielle	74
IV - Etude de la fraction lipidique de la peptidolipine NA	76
1/ Hydrolyse de la peptidolipine NA par HCl 6 N	76
2/ Synthèse de l'acide 2- <i>trans</i> -eicosénoïque	77
3/ Synthèse du 3-hydroxyeicosanoate de méthyle	77
4/ Synthèse du N-(3-hydroxyeicosanoyl)-alaninate d'éthyle	78
5/ Hydrolyse de la peptidolipine NA selon Crombie*	79
V - Structure de la peptidolipine NA	80
1/ Action de l'hydroxylamine	80
2/ Réduction de la peptidolipine NA	80
3/ Saponification ménagée de la peptidolipine NA	81
4/ Hydrolyse ménagée de la peptidolipine NA ..	82
5/ Oxydation chromique de la peptidolipine NA	82

	Pages
RESUME ET CONCLUSIONS	83
BIBLIOGRAPHIE	85
TABLE DES MATIERES	91

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

COUPURES SPECIFIQUES NON ENZYMATIQUES DES CHAINES PEPTIDIQUES

Vu et approuvé :

Le Doyen de la Faculté des Sciences
J. BRACONNIER

Vu :

Les Membres du Jury,
MM. CHOPIN Président
LEDERER }
G. MICHEL } Examinateurs

Vu et accordé le permis d'imprimer :

Lyon, le 10 Mai 1965

Le Recteur,
Président du Conseil de l'Université,
P. LOUIS

IMPRIMERIE LOUIS-JEAN

Ouvrages scientifiques

TYPO - OFFSET

GAP (Hautes-Alpes)

Dépôt légal n° 145
1965

